



FACULTAD DE  
CIENCIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**NUEVAS FUNCIONES DEL SUPRESOR DE  
TUMORES PTEN EN METABOLISMO Y  
ENVEJECIMIENTO**

**TESIS DOCTORAL**

**ANA ORTEGA MOLINA  
LICENCIADA EN BIOQUIMICA**

**MADRID, 2011**



El trabajo desarrollado en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección y tutoría del Dr. Manuel Serrano Marugán





A mis padres y a mi hermana Isabel.



## **AGRADECIMIENTOS**



En este momento, al terminar de escribir esta tesis y finalizar una etapa de mi vida me gustaría pararme a reflexionar un momento y agradecer a todas las personas que de un modo u otro habéis formado parte de mi vida y me habéis ayudado a realizar esta tesis.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Manolo, mi jefe y director de tesis, por darme la oportunidad de entrar en su laboratorio para realizar esta tesis. Por confiar en mí para el desarrollo del proyecto. Por todo lo que he aprendido en las reuniones que hemos tenido donde siempre surgía algún nuevo experimento que hacer. Gracias por tu paciencia y tu constancia.

En segundo lugar, a Alejo, para mí mucho más que un compañero de laboratorio, mi co-director de tesis. Aunque te fuiste casi hace tres años del laboratorio, siempre has estado dispuesto a ayudarme y a apoyarme para que este trabajo saliera adelante, dándome ánimos en los momentos difíciles.

A mis padres por confiar en mí, porque siempre habéis estado a mi lado ayudándome, apoyándome y escuchándome día a día. Sin vosotros este trabajo no hubiese sido posible.

A mi hermana Isabel, mi alma gemela, por tu ayuda, por tu paciencia infinita conmigo, por todas nuestras conversaciones, tus consejos...no es lo mismo en casa sin ti.

A mis cuatro abuelos, Valentina, Juan, Maruja y en especial a mi abuelo Pepe, que nos dejaste en este último año, y que te hubiese encantado verme terminar esta tesis, pero sé que siempre estarás conmigo. Por vuestro cariño, vuestra sonrisa y por tratar de comprender ese trabajo tan “raro” que tengo...

A Alfonso, por estar todo este tiempo a mi lado; llevamos toda una vida juntos; por escucharme, por aguantarme cuando no he tenido un buen día, por tus bromas, tu sonrisa y tus palabras de aliento.

A Águeda, por tu paciencia y tu apoyo incondicional, tus consejos tanto en temas personales como laborales. Has sido imprescindible en estos cinco años, siempre me has tendido la mano cuando lo he necesitado y siempre me has animado cuando he

tenido algún problema. A mis compis del primer pasillo que ya se fueron, Isabel e Irene; os echo de menos. Todavía me acuerdo del primer día que llegué al laboratorio, Isabel, me ayudaste en todo lo que pudiste sin conocermelo y a partir de ahí surgió una gran amistad. Que bien nos lo pasamos en Argentina en la boda de Ague! ¡Fue un viaje maravilloso! El laboratorio sin la jovialidad de Irene y sin la sonrisa permanente de Isabel, no es el mismo.

A María, gracias por estar a mi lado cuando más lo he necesitado. Siempre has estado dispuesta a escucharme y a darme tu opinión sobre la vida. Por nuestros “siéntate aquí”, conversaciones que nos han ayudado a desahogar nuestras “penas” y con las que nos hemos reído muchísimo también.

A Maribel, por tu ayuda incondicional; sin ti nunca hubiese podido realizar ni la mitad de experimentos que están presentes en esta tesis. Has dejado un vacío en todos nosotros al irte.

A Cristina, nuestra reina Pantoja, por estar siempre dispuesta a ayudarme y dejar todo lo que estabas haciendo para resolver mis dudas. Trabajar codo con codo contigo ha sido genial.

A mis compañeros de tesis, “los peques”, Arancha y Dani. A Arancha, por estar siempre dispuesta a escucharme. A Dani, por estar dispuesto a ayudarme siempre en lo que he necesitado aunque estuvieses hasta arriba de trabajo y por animarme y darme fuerzas cuando las cosas en el laboratorio no salían bien. Os deseo lo mejor en vuestra nueva etapa en Nueva York. Quien sabe, quizá dentro de no tanto ¡volvamos a trabajar en la misma ciudad!

A Pablo, por tu alegría y generosidad, oírte pasar diciendo Buenooooos diaaaaaaaaas cada mañana te daba energías para continuar trabajando. Te echo de menos, menos mal que dentro de poquito... ¡vuelves a estar con nosotros!

A mis nuevos compis de tesis, Elena, Ade, Lucía, Lluç, Ianire, Miguel y María García. Habéis traído muy buen ambiente al laboratorio con vuestras risas y bromas; desde

que llegasteis siempre me habéis apoyado y ayudado; me encanta trabajar a vuestro lado.

A Gema, por ayudarme día a día con el trabajo con ratones y por nuestras conversaciones en la E-1.

A Marta Cañamero, por ser la mejor profesora de patología que he tenido y a su Unidad de Patología Comparada al completo: Patri, Vir, Elvira, María y Natalia. Por vuestra ayuda y por vuestra paciencia.

A los demás miembros del Laboratorio de Supresión Tumoral y Telómeros y Telomerasa presentes y pasados: Daniela, Susana Llanos, Han, Cian, Sandrina, Manuel, Antonio, Dani Muñoz, Luis Enrique, Nora, Elisa Santos, Peter, Rosa, Ralph, Fabian, Martina, Gina, Merche, Paula, Nani, Bruno, Alejandro, Isabel López, Elisa Varela, Katerina, Rebecca, Carolyn, Gerdine, Raquel, Andrés, Toñi, Elsa, Stefan, Roberta, Susana Velasco, Puri y Oscar.

A mi amiga Patricia, casi como mi hermana, que nos conocemos desde los 8 años. Por estar siempre, siempre a mi lado y por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis amigas Patricia, Paula, Ana Belén, Aldara y Leticia por haber estado cerca de mí apoyándome durante estos cinco años, por vuestro cariño y por el interés que mostrasteis en este trabajo que muchas veces era incomprensible.

A mis amigas de Bioquímica; Bea, Noe, Helena, Diana y Paula. Por haber estado siempre a mi lado y ayudarme en los momentos difíciles. Gracias Diana y Noe por esas escapadas para descubrir los mundos submarinos, que hacían que te olvidaras por unos días del agobio de la gran ciudad...

¡Muchas gracias a todos!

## ÍNDICE





|  |    |
|--|----|
| RESUMEN/SUMMARY .....  | 1  |
| ABREVIATURAS .....   | 5  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 9  |
| 1. El supresor de tumores PTEN .....   | 11 |
| 1.1. Estructura de PTEN .....  | 11 |
| 1.2. Regulación de PTEN.....   | 12 |
| 1.2.1. Modulación transcripcional y post-transcripcional.....  | 12 |
| 1.2.2. Modificaciones post-traduccionales .....  | 14 |
| 1.2.3. Interacción con otras proteínas .....   | 15 |
| 1.3. Funciones de PTEN .....   | 15 |
| 2. Ruta de señalización PI3K/ AKT .....  | 19 |
| 2.1. Regulación de la ruta de señalización de AKT/PI3K .....   | 22 |
| 2.2. Ruta de señalización de PI3K/ AKT y metabolismo .....   | 23 |
| 2.2.1. Metabolismo de la glucosa.....  | 23 |
| 2.2.2. Metabolismo de lípidos .....  | 24 |
| 2.2.3. Obesidad y diabetes.....  | 24 |
| 2.3. Papel de la ruta de señalización de la insulina en longevidad.....                                      | 25 |
| 2.3.1. Ruta de señalización de IGF1/insulina.....  | 25 |
| 2.3.2. Otras rutas implicadas en metabolismo y envejecimiento .....  | 28 |
| 3. El tejido adiposo marrón (BAT).....   | 30 |
| 3.1. Origen del tejido adiposo marrón .....  | 30 |
| 3.2. Función del tejido adiposo marrón .....   | 32 |
| 3.3. El tejido adiposo marrón en humanos .....   | 34 |
| OBJETIVOS .....  | 35 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 39 |
| 1. Generación del ratón transgénico.....   | 41 |
| 2. Experimentación animal.....   | 41 |
| 2.1. Carcinogénesis inducida por 3-metilcolantreno.....  | 41 |
| 2.2. Caracterización metabólica.....   | 42 |
| 2.2.1. Ensayo de cajas metabólicas .....   | 42 |
| 2.2.2. Medidas de adiposidad y de densidad ósea .....  | 42 |
| 2.2.3. Estudios de calorimetría indirecta .....  | 42 |
| 2.2.4. Estudios de actividad y medida de temperatura corporal.....   | 43 |
| 2.2.5. Test de tolerancia a la glucose y a la insulina.....  | 43 |
| 2.2.6. Captación de glucosa por tomografía de emisión de positrones (PET, positron emission tomography)..... | 43 |
| 2.2.7. Análisis de metabolitos en sangre y suero.....  | 44 |
| 2.3. Experimentos <i>in vivo</i> con los inhibidores de PI3K .....   | 44 |
| 2.4. Histología e inmunofluorescencia .....  | 45 |
| 3. Experimentos <i>in vitro</i> .....  | 46 |
| 3.1. Preparación de fibroblastos murinos embrionarios (MEFs) .....   | 46 |
| 3.2. Transducción retroviral .....   | 47 |
| 3.3. Ensayo de formación de colonias .....   | 48 |
| 3.4. Ensayo de formación de focos.....   | 48 |
| 3.5. Ensayo de proliferación 3T3 .....   | 48 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.6. Estudio de la señalización de la ruta de insulina .....   | 49  |
| 3.7. Diferenciación de adipocitos.....   | 49  |
| 3.8. Experimentos in vitro con los inhibidores de PI3K.....  | 50  |
| 3.9. Generación de tejido adiposo marrón ectópico .....  | 50  |
| 4. Ensayos bioquímicos.....  | 50  |
| 4.1. Extracción de ADN.....  | 50  |
| 4.2. Extracción de ARN y análisis de ADNc por RT-PCR .....   | 51  |
| 4.3. Extracción de proteínas e inmunodetección .....   | 51  |
| 5. Análisis estadísticos .....   | 52  |
| 6. Tablas de oligonucleótidos utilizadas.....  | 52  |
| RESULTADOS .....   | 55  |
| 1. Generación del ratón transgénico Pten.....  | 57  |
| 2. Caracterización del ratón transgénico Pten .....  | 59  |
| 2.1. Expresión del alelo transgénico de Pten.....  | 59  |
| 2.2. Funcionalidad del transgén.....   | 60  |
| 2.2.1. Funcionalidad del transgén in vitro. Estudios en MEFs.....  | 60  |
| 2.2.2. Funcionalidad del transgén in vivo.....   | 63  |
| 3. Estudio del efecto de Pten sobre metabolismo.....   | 64  |
| 3.1. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el peso corporal.....   | 64  |
| 3.2. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre la ingesta .....  | 67  |
| 3.3. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el gasto energético .....   | 68  |
| 3.4. Impacto de la sobre-expresión de Pten en el tejido adiposo blanco .....   | 74  |
| 3.5. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el daño metabólico producido por HFD ...                            | 76  |
| 3.6. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el metabolismo de la glucosa .....                                  | 77  |
| 3.7. Impacto de la sobre-expresión de Pten en el tejido adiposo marrón.....  | 79  |
| 3.7.1. Inhibición de PI3K en líneas celulares.....   | 83  |
| 3.7.2. Inhibición de PI3K <i>in vivo</i> .....   | 87  |
| 3.7.3. Generación de tejido adiposo marrón ectópico a partir de fibroblastos embrionarios .....                      | 88  |
| 3.8. Impacto de la sobre-expresión de Pten en el músculo.....  | 89  |
| 4. Estudio del efecto de los inhibidores de PI3K sobre obesidad.....   | 90  |
| 4.1. Efecto de la inhibición de PI3K por el Compuesto A en obesidad .....  | 91  |
| 4.2. Efecto de la inhibición de PI3K por el Compuesto A y GDC-0941 en obesidad .....                                 | 96  |
| 5. Estudio del efecto de Pten sobre el envejecimiento .....  | 100 |
| 5.1. Análisis del efecto de la sobre-expresión de Pten en la longevidad .....  | 100 |
| 5.2. Análisis del efecto de la sobre-expresión de Pten sobre el desarrollo espontáneo de tumores .....               | 103 |
| 5.3. Análisis del efecto de la sobre-expresión de Pten sobre marcadores asociados al proceso de envejecimiento ..... | 104 |
| 5.3.1. Acumulación de daño en el ADN.....  | 104 |
| 5.3.2. Coordinación neuromuscular.....   | 105 |
| 5.3.3. Sensibilidad a la insulina .....  | 105 |
| 5.3.4. Otros marcadores de envejecimiento .....  | 108 |

|  |     |
|--|-----|
| DISCUSIÓN .....  | 111 |
| 1. PTEN y metabolismo .....                                  | 113 |
| 1.1. PTEN y tejido adiposo marrón .....                      | 114 |
| 1.2. Inhibidores de PI3K como tratamiento anti-obesidad..... | 116 |
| 2. PTEN y envejecimiento.....                                | 119 |
| 3. PTEN y cáncer.....  | 124 |
| CONCLUSIONES.....  | 127 |
| BIBLIOGRAFÍA .....   | 131 |
| ANEXO .....  | 157 |



## **RESUMEN/SUMMARY**



Decreased signalling of insulin and Igf1 increases longevity across animal evolution, including mammals. The effects of insulin/Igf1 on aging are intracellularly mediated by the PI3K/Akt/Foxo pathway in worms and flies. Here, we have extended this paradigm to mammals by directly attenuating PI3K signalling in mice through moderate overexpression of the tumour suppressor *Pten* under its own transcriptional regulatory elements. *Pten<sup>tg</sup>* mice have lower levels of PI3K signalling, are protected from cancer, and present a significant extension of lifespan that is independent of their lower cancer incidence. Interestingly, *Pten<sup>tg</sup>* mice show an elevated rate of energy expenditure, which is accompanied by decreased adiposity and protection from high-fat diet-induced liver damage. Accounting for the elevated energy expenditure, we found that brown and white adipose tissues from *Pten<sup>tg</sup>* mice express high levels of the uncoupling protein Ucp1 and its transcriptional activator Pgc1 $\alpha$ , and the relative uptake of glucose by brown adipose tissue (BAT) is constitutively increased. Also, the BAT of *Pten<sup>tg</sup>* mice contains lower levels of phosphorylated Akt, which is a negative regulator of both Pgc1 $\alpha$  and its critical partner Foxo1. In support of this, a synthetic PI3K inhibitor elevates the expression of Pgc1 $\alpha$  and Ucp1 *in vitro* differentiated brown adipocytes, as well as, in the BAT of adult mice. Finally, *Pten<sup>tg</sup>* fibroblasts programmed *in vitro* with Prdm16 and C/EBP $\beta$ , master factors for brown adipocyte differentiation, formed ectopic subcutaneous brown adipose pads more efficiently than similarly programmed non transgenic fibroblasts, altogether indicating that the effects of Pten on brown adipocytes are cell autonomous. These observations extend to mammals the evolutionary conserved modulation of organism survival by the PI3K pathway and uncover a role of Pten in promoting energy expenditure by brown adipocytes, thus decreasing the caloric input to the rest of the organism and its associated damage. . In an attempt to translate these results to a pathological setting, we have tested the ability of synthetic PI3K inhibitors (PI3Kis) to decrease adiposity in obese mice. Importantly, diet-induced obese mice treated for two weeks with (PI3Kis) showed the appearance of brown adipocytes within the white adipose tissue, a significant decrease in adiposity, reduction of liver steatosis, and, finally, a significant decrease in body weight. These results provide proof of concept for the therapeutic treatment of obesity with PI3Kis.





## **ABREVIATURAS**



## Abreviaturas

- 3MC: 3-metil-colantreno
- 4EBP1: *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*
- aa: aminoácido
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ácido desoxirribonucleico copia
- AKT: *thymoma viral proto-oncogene 1*
- ARN: ácido ribonucleico
- AUC: *Area under curve*, área bajo la curva
- BAC: *Bacterial artificial chromosome*; cromosoma artificial bacteriano
- BAD: *BCL2-associated agonist of cell death*
- BAT: *Brown adipose tissue*; tejido adiposo marrón
- cAMP: adenosín monofosfato cíclico
- CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
- CR: *Calorie restriction*; restricción calórica
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
- DS: desviación estándar
- eEF2: *eukaryotic translation elongation factor 2*
- eIF4B: *eukaryotic translation initiation factor 4B*
- eIF4E: *eukaryotic translation initiation factor 4E*
- FADH: flavinina adenina dinucleótido
- FKBP12: *FK506 binding protein 12*
- FOXO: *forkhead box O*
- G6Pc: *glucose-6-phosphatase, catalytic*
- GTT: *Glucose Tolerance Test*; test de tolerancia a la glucosa
- GSK3: *glycogen synthase kinase 3*
- H&E: Hematoxilina/Eosina
- IGF1: *insulin-like growth factor 1*
- IHQ: Inmunohistoquímica
- ITT: *Insulin Tolerance Test*; test de tolerancia a la insulina
- IIB: Instituto de Investigaciones Biomédicas
- IRS1: *insulin receptor substrate 1*
- Kb: kilobase
- KO: *Knock-out*
- MEFs: *mouse embryo fibroblasts*; fibroblastos embrionarios de ratón
- MDM2: *Mdm2 p53 binding protein homolog*
- mTORC1/2: *mammalian target of rapamycin complex 1/2*
- NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
- PBS: *phosphate buffer saline*; tampón fosfato salino
- PDCD4: *programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)*
- PCR: *polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa
- PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase 1*
- PEPCK: *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*
- PGC1 $\alpha$ : *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha*
- PHLPP: *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase*
- PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa
- PIP2: fosfatidilinositol (4, 5)-difosfato.
- PIP3: fosfatidil inositol (3, 4, 5)-trifosfato

- PP2A: *protein phosphatase 2A*
- PTEN: *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
- PRAS40: *proline-rich AKT substrate of 40KDa*
- Rheb: *Ras homolog enriched in brain*
- RIPA: *radioimmunoprecipitation assay*
- S6K: *ribosomal protein S6 kinase*
- Ser: *Serina*
- Tg: *transgén*
- Thr: *treonina*
- TSC1/2: *tuberous sclerosis 1/2*
- Trb3: *pseudokinase tribble-3*
- u.a: *unidades arbitrarias*
- WAT: *white adipose tissue; tejido adiposo blanco*
- Wt: *wild-type; silvestre*

## INTRODUCCIÓN



## 1. El supresor de tumores PTEN

PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) es uno de los genes supresores de tumores más frecuentemente mutados en cáncer humano. Se descubrió independientemente por dos grupos que encontraron un gen en el cromosoma 10q23 que se perdía muy frecuentemente en cáncer y que presentaba mutaciones en cánceres humanos primarios (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). La frecuencia de mutaciones monoalélicas en el locus donde se encuentra PTEN es del 50%-80% carcinomas de endometrio, glioblastomas y cáncer de próstata, y entre un 30%-50% en cáncer de pulmón, colon y mama. La pérdida completa de PTEN por delección se observa muy frecuentemente en cáncer de endometrio y glioblastoma y se asocia generalmente con cánceres muy avanzados o incluso metástasis (Ali et al., 1999).

La importancia de PTEN como supresor tumoral también se apoya en el estudio de mutaciones en la línea germinal en un grupo de síndromes autosómicos dominantes caracterizados por trastornos en el desarrollo, deficiencias neurológicas, desarrollo de hamartomas y mayor predisposición a desarrollar cáncer de mama, tiroides y endometrio. En conjunto estos síndromes se denominan *PTEN hamartoma tumour syndromes (PHTS)* que incluyen el síndrome de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos, el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba y el síndrome de Proteus. Varios modelos animales que poseen delecciones en el gen PTEN demuestran un papel muy importante de PTEN como supresor tumoral en múltiples tipos de tumores (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Suzuki et al., 1998; Trotman et al., 2003; Wang et al., 2003).

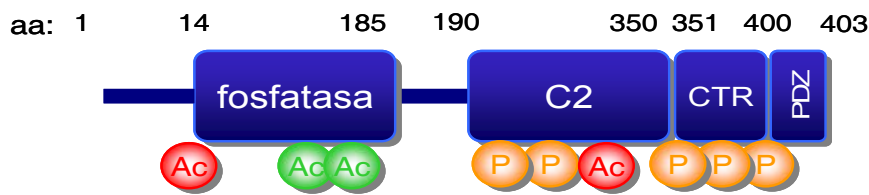
### 1.1. Estructura de PTEN

PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) es una proteína de 50KDa codificada por el gen PTEN, que en humanos, se localiza en el cromosoma 10 en la región q23 y en ratones se localiza en el cromosoma 19 en la región qC1, el cual tiene una extensión de 105 kb e incluye 9 exones.

La proteína PTEN está formada por dos dominios clave que se requieren para su función como supresor tumoral (**Figura 1**): el dominio fosfatasa (desde el aminoácido



14 al 185) (Furnari et al., 1998) con un sitio activo entre los aminoácidos 123 y 130 (Lee et al., 1999) y el dominio C2 de unión a la membrana (desde el aminoácido 190 al 350) (Georgescu et al., 2000). También contiene una región carboxiterminal (C-terminal) (CTR) que contiene secuencias que contribuyen a su estabilidad y actividad (Georgescu et al., 1999). Además, posee un dominio PDZ que le permite interactuar con otras proteínas (Adey et al., 2000) y también puede controlar la localización subcelular de PTEN, aunque la delección de estos tres aminoácidos no afecta a la función supresora de tumores de PTEN (Georgescu et al., 1999).



**Figura 1.** Estructura proteica de PTEN y sus modificaciones post-traduccionales.

## 1.2. Regulación de PTEN

Los genes supresores de tumores están sujetos a estrictos mecanismos de regulación que incluye marcas epigenéticas, modulación transcripcional y modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales que rigen los niveles de proteína, su actividad, localización, proteínas de unión y su función.

### 1.2.1. Modulación transcripcional y post-transcripcional

PTEN fue originariamente clonado como un gen regulado transcripcionalmente por TGF $\beta$  (Li et al., 1997). Desde su descubrimiento, se han encontrado muchos factores que regulan la transcripción de PTEN incluyendo PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$* ) (Patel et al., 2001) y EGR-1 (Virolle et al., 2001; Yu et al., 2009). Se ha encontrado además un elemento de unión al ADN para p53 en el promotor de PTEN (Stambolic et al., 2001).

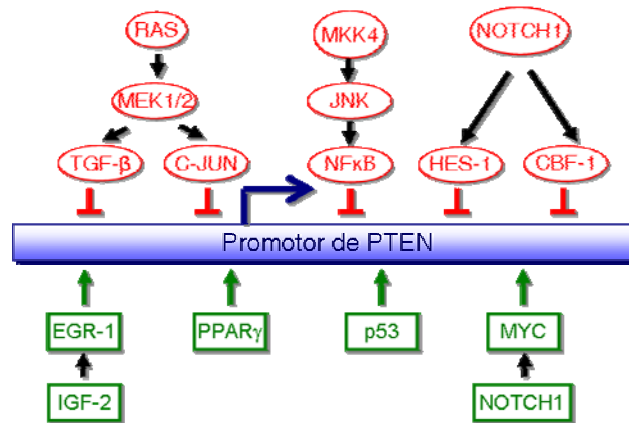
El control negativo de la transcripción de PTEN puede jugar un papel muy importante en cáncer. Estudios recientes han demostrado una relación entre la ruta de señalización oncogénica RAS-MAPK y la reducción de la transcripción de PTEN en líneas tumorales humanas. En concreto, en adenocarcinomas de páncreas se atribuye esta reducción de

la transcripción de PTEN a un mecanismo dependiente de TGF $\beta$  activado por Ras (Chow et al., 2007). En segundo lugar, se ha demostrado que la ruta de señalización RAS-RAF-MEK-ERK regula negativamente los niveles de PTEN a través de el factor de transcripción c-Jun (Hettinger et al., 2007). Además se ha visto que otras rutas de señalización de quinasas como MEKK4 y JNK promueven la supervivencia celular y un bloqueo de la apoptosis al suprimir la transcripción de PTEN por la unión directa de NF $\kappa$ B al promotor de PTEN (Xia et al., 2007). Contrariamente, se ha visto que PTEN regula negativamente la ruta de señalización de JNK (Vivanco et al., 2007), lo que sugiere que rutas que son reguladas negativamente por PTEN también puedan regular la transcripción de PTEN estableciendo un lazo de retroalimentación (*feedback loop*). **(Figura 2a)**

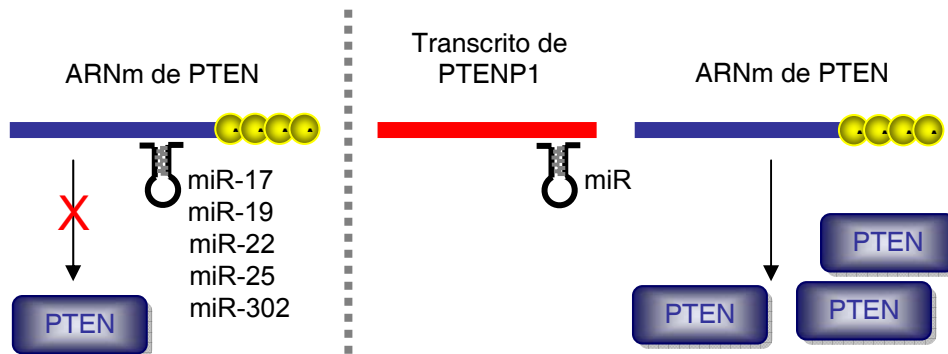
La transcripción de PTEN también está controlada por la ruta de señalización de NOTCH1. Se ha demostrado que la activación de la ruta de NOTCH1 reprime la transcripción de PTEN a través del factor CBF-1 (RBP-J $\kappa$ ) (Whelan et al., 2007) y a través del factor de transcripción HES-1 (Palomero et al., 2007), aunque este mismo laboratorio ha publicado que NOTCH1 induce la expresión de MYC (Palomero et al., 2006; Weng et al., 2006) y este a su vez induce la transcripción de PTEN. Esto demuestra que la regulación de PTEN por la ruta de señalización de NOTCH1 es compleja y multifactorial y depende del sistema que se estudie. **(Figura 2a).**

Recientemente se ha descubierto regulaciones post-transcripcionales del ARN mensajero de PTEN que permiten en una menor o mayor medida la traducción de PTEN. Este es el caso de los microARNs, que son moléculas de ARN de cadena única de unos 22 nucleótidos de longitud que se unen a secuencias parcialmente complementarias generalmente presentes en la región 3'UTR del ARN mensajero del gen que regulan, inhibiendo su traducción. Se han descubierto varias familias de microARNs que regulan la traducción de PTEN: miR-21 (Meng et al., 2006; Meng et al., 2007), miR-17 y miR-19 (Koralov et al., 2008; Lewis et al., 2003; Takakura et al., 2008; Xiao et al., 2008), miR-22, miR-25 y miR-302 (Poliseno et al., 2010a). Además se ha descubierto que el pseudogen de PTEN, PTENP1, actúa como señuelo de los microRNAs que inhiben a PTEN y por lo tanto PTENP1 favorece la traducción de PTEN (Poliseno et al., 2010b; Rigoutsos and Furnari, 2010). **(Figura 2b)**

a



b



**Figura 2.** Regulación transcripcional y post-transcripcional de PTEN

### 1.2.2. Modificaciones post-traduccionales

La estabilidad de la proteína PTEN se regula por su interacción con otras proteínas y esta interacción viene mediada por sus modificaciones post-traduccionales. La fosforilación de PTEN en residuos específicos de su dominio C-terminal se ha asociado tanto a un aumento de su estabilidad (Georgescu et al., 1999; Torres and Pulido, 2001; Vazquez et al., 2000) como a una disminución de la misma (Maccario et al., 2007). Además la fosforilación de PTEN conlleva a una disminución de la actividad catalítica debido a cambios conformacionales que le impida unirse a la membrana plasmática. En total, se han descrito seis sitios de fosforilación en T366, S370, S380, T382, T383, S385 implicadas en modular la función de PTEN, su distribución celular y su estabilidad. **(Figura 1)**. Se ha propuesto que la fosforilación en los residuos S380, T382 y T383 confiere a PTEN una conformación cerrada mientras que la no fosforilación abre la conformación proteica aumentando la actividad de PTEN, la interacción con otras

proteínas lo que a su vez hace a PTEN más inestable y susceptible a degradación (Leslie and Downes, 2004; Vazquez et al., 2001).

Otra de las modificaciones que regulan los niveles proteicos de PTEN es la ubiquitilación. PTEN se ubiquitila en la K13 y en la K289 (Trotman et al., 2007) y la enzima E3 ligasa que lleva a cabo la mono y poliubiquitilación de PTEN es NEDD4-1 (Wang et al., 2007) (**Figura 1**).

También se ha estudiado que modificaciones como la acetilación pueden afectar a la actividad de PTEN. Por ejemplo, la interacción de PTEN con la histona acetiltransferasa PCAF promueve su acetilación en K125 y K128, lo que regula negativamente la actividad catalítica de PTEN (Okumura et al., 2006).

Así pues, la modulación de la actividad de PTEN por sus modificaciones post-traduccionales representa un mecanismo de regulación de PTEN teóricamente explotable en aproximaciones terapéuticas.

### 1.2.3. Interacción con otras proteínas

PTEN, mediante su región C-terminal puede interaccionar con múltiples proteínas como CK2 (*casein kinase 2*) y GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) que median la fosforilación de PTEN (Al-Khouri et al., 2005; Miller et al., 2002; Torres and Pulido, 2001); también interacciona con PICT1 la cual favorece su fosforilación y estabilidad (Okahara et al., 2004). Además mediante su dominio PDZ (aa 400-403) puede interaccionar con otras proteínas como NHERF (*Na<sup>+</sup> H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor*) y MAGI-2 (*membrane-associated guanylate kinase inverted 2*) que sirve para reclutar a PTEN a la membrana plasmática (Takahashi et al., 2006; Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2000). Otros estudios han demostrado que PTEN se une a p53 lo que aumenta la estabilidad de p53 y aumenta su actividad transcripcional (Freeman et al., 2003; Trotman and Pandolfi, 2003).

## 1.3. Funciones de PTEN

Mutaciones somáticas y deleciones así como el silenciamiento transcripcional de PTEN debido a metilación de su promotor son comunes en muchos tipos de tumores. Esto

incluye los tumores asociados a los síndromes PHTS como tumores de mama, endometrio y tiroides pero también tumores en el sistema nervioso, próstata, pulmón, páncreas, hígado y glándula adrenal así como melanoma, leucemia y linfoma. Todo ello hace que PTEN sea considerado como uno de los más importantes supresores de tumores junto con p53 y INK4a/ARF. En la siguiente tabla se resume las alteraciones de PTEN en distintos tipos de cáncer.

| Tejido             | Alteraciones en cáncer humano   | Tumores en ratones Pten <sup>+/-</sup> | Deleción de Pten específica de tejido       | Tumores en combinación con alteraciones en otros genes*                             | Referencias  |
|--------------------|---|--|---|---|--|
| Mama               | <5% mutaciones, 40% LOH <sup>1</sup> , 50% metilación del promotor y 40% pérdida de expresión | Sí                                     | Tumores                                     | Wnt-tg Erbb-tg  | (Li et al., 2002; Li et al., 2001; Schade et al., 2009)  |
| Endometrio         | 35-50% mutaciones   | Sí                                     | SP  | Mlh1 <sup>-/-</sup>   | (Beiner et al., 2006; Risinger et al., 1997; Tashiro et al., 1997; Wang et al., 2002)  |
| Tiroides           | <10% deleción de los dos alelos, >50% metilación del promotor                                 | Sí                                     | Adenomas foliculares                        | Thrb-tg   | (Alvarez-Nunez et al., 2006; Frisk et al., 2002; Guigon et al., 2009; Halachmi et al., 1998)   |
| Próstata           | LOH frecuente y expresión de miR-22 y miR-106b-25   | Inicio tardío                          | Tumores de inicio temprano e invasivos      | Cdkn1b <sup>+/-</sup><br>Nkx31 <sup>+/-</sup><br>Par4 <sup>-/-</sup><br>Tmprss2-Erg | (Abate-Shen et al., 2003; Cairns et al., 1997; Di Cristofano et al., 2001; Fernandez-Marcos et al., 2009; King et al., 2009; Wang et al., 2003; Wang et al., 1997) |
| Leucemia o linfoma | 10% deleción en T-ALL y 27% mutaciones en T-ALL   | Linfoma                                | Linfoma                                     | SP  | (Gronbaek et al., 1998; Gutierrez et al., 2009; Mao et al., 2003; Sakai et al., 1998; Suzuki et al., 1998)   |
| Glioma             | 70% LOH, 44% mutaciones y amplificación de miR-26a  | SP                                     | Macrocefalia y anormalidades en el cerebelo | H-Ras mutado, p53 <sup>-/-</sup> , p53 <sup>+/-</sup> , Nf1 <sup>+/-</sup>          | (Backman et al., 2001; Huse et al., 2009; Kwon et al., 2008; Kwon et al., 2001; Wang et al., 1997; Wei et al., 2006; Zheng et al., 2008)                           |

| Tejido            | Alteraciones en cáncer humano  | Tumores en ratones Pten <sup>+/-</sup> | Deleción de Pten específica de tejido                         | Tumores en combinación con alteraciones en otros genes* | Referencias  |
|-------------------|--|--|---|---|--|
| Melanoma          | 30-60% LOH, 10-20% mutaciones y >50% metilación del promotor                                     | SP                                     | No espontáneos pero sí inducidos con carcinógenos             | Braf <sup>-/-</sup><br>Cdkn2a <sup>-/-</sup>            | (Dankort et al., 2009; Guldberg et al., 1997; Inoue-Narita et al., 2008; Lahtz et al., 2010; You et al., 2002)               |
| Pulmón            | metilación del promotor frecuente, 74% miR-21 sobreexpresado y 74% pérdida de PTEN               | SP                                     | Adenocarcinomas y tumores de pulmón inducido por carcinógenos | K-Ras mutado  | (Iwanaga et al., 2008; Kohno et al., 1998; Marsit et al., 2005; Soria et al., 2002; Yanagi et al., 2007; Zhang et al., 2010) |
| Hígado            | <5% mutaciones, 12% pérdida de PTEN  | Infrecuente                            | Hígado graso  | Vhl <sup>-/-</sup>                                      | (Chen et al., 2010; Dong-Dong et al., 2003; Yao et al., 1999)  |
| Vejiga            | 23% LOH, 6% deleción de los dos alelos, 23% mutaciones, 53% expresión reducida o ausente de PTEN | SP                                     | Carcinomas en el 10%  | p53 <sup>-/-</sup>                                      | (Cairns et al., 1998; Puzio-Kuter et al., 2009; Tsuruta et al., 2006)  |
| Riñón             | 25% LOH  | SP                                     | SP  | SP  | (Cairns et al., 1998)  |
| Páncreas          | Localización alterada  | SP                                     | Metaplasia y 20% carcinomas                                   | Smad4 <sup>-/-</sup>                                    | (Perren et al., 2000; Stanger et al., 2005; Xu et al., 2010)   |
| Glándula adrenal  | LOH más común en tumores malignos que en benignos  | Si                                     | SP  | Cdkn2a <sup>-/-</sup>                                   | (van Nederveen et al., 2006; You et al., 2002)   |
| Colon e intestino | >18% mutaciones, >19% LOH dependiendo del tipo de tumor  | hiperplasias                           | SP  | Apc <sup>+/-</sup>                                      | (Di Cristofano et al., 1998; Shao et al., 2007; Zhou et al., 2002)   |

**Tabla 1. Alteraciones de PTEN en distintos tipos de cáncer.**

<sup>1</sup>LOH: pérdida de heterocigosis; SP: sin publicar, T-ALL: leucemia linfocítica aguda de células T. \*En presencia de las alteraciones adicionales de los genes que se señalan, la alteración de PTEN (Pten<sup>+/-</sup> o Pten-nulo específico de tejido) conlleva a disminuir la latencia del tumor o aumenta el grado del tumor.

PTEN actúa como fosfatasa lipídica la cual regula negativamente la ruta de señalización PI3K-AKT-mTOR (Stambolic et al., 1998; Wu et al., 1998). Hay muchas evidencias que indican que es la actividad fosfatasa lipídica es la responsable de su función supresora (Myers et al., 1998). Se ha especulado con su posible papel como fosfatasa proteica y su papel en migración celular pero no se han identificado los

posibles sustratos ni los mecanismos efectores de la actividad fosfatasa proteica de PTEN (Leslie et al., 2009).

La actividad fosfatasa lipídica de PTEN desfosforila el segundo mensajero fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3) generado por PI3K, a fosfatidilinositol (4,5)-difosfato (PIP2) (Maehama and Dixon, 1998; Stambolic et al., 1998). PIP3 puede activar quinasas como PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) y AKT1, AKT2 y AKT3 (*thymoma viral proto-oncogene 1* o también conocida como PKB).

Inicialmente se asumió que PTEN ejercía todas sus funciones en el citoplasma pero estudios posteriores y el desarrollo de mejores anticuerpos han situado a PTEN no sólo en el citoplasma sino también en el núcleo de neuronas (Lachyankar et al., 2000), tiroides (Gimm et al., 2000), páncreas (Perren et al., 2000), piel (Whiteman et al., 2002a), músculo liso (Deleris et al., 2003) y mucosa intestinal (Trotman et al., 2007). Muchos estudios han sugerido que parte del papel de PTEN como supresor tumoral se debe a su función nuclear ya que su ausencia del núcleo se ha relacionado con tumores más agresivos en pacientes con carcinoma de esófago (Tachibana et al., 2002), melanoma (Whiteman et al., 2002a), cáncer colorrectal (Zhou et al., 2002), tumores en los islotes pancreáticos (Perren et al., 2000) y casos de linfoma de célula B (Fridberg et al., 2007). La función de PTEN en el núcleo no está mediada por la ruta de señalización de AKT (Liu et al., 2005). Se ha propuesto que PTEN regula el ciclo celular al suprimir la actividad de la ciclina D1, bien por inhibición de su transcripción o bien por limitar su acumulación nuclear (Chung et al., 2006; Radu et al., 2003). Otros estudios han demostrado que PTEN se une a la acetiltransferasa de histonas nuclear PCAF que acetila a PTEN en K125 y K128 y regula negativamente su actividad (Okumura et al., 2006); también se une ap300/CBP (Li et al., 2006) que promueve la acetilación de p53 en respuesta al daño en el ADN. También se ha propuesto un papel de PTEN en el mantenimiento de estabilidad cromosómica. Un estudio propone que AKT fosforila e inhibe a CHK1, lo que impide que esta proteína vaya al núcleo y ejerza su papel en el control del daño al ADN (Puc and Parsons, 2005). En otro estudio se propone que PTEN interacciona con la proteína centromérica CENP-C, manteniendo la estabilidad cromosómica y puede participar en el control del daño al ADN ya que regula la transcripción de RAD51, una proteína esencial para la reparación de la roturas de doble cadena del ADN (DSBs, *double strand breaks*) (Shen et al., 2007). La importación de

PTEN al núcleo depende del ciclo celular y está regulada por la ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR/S6K (Liu et al., 2007)

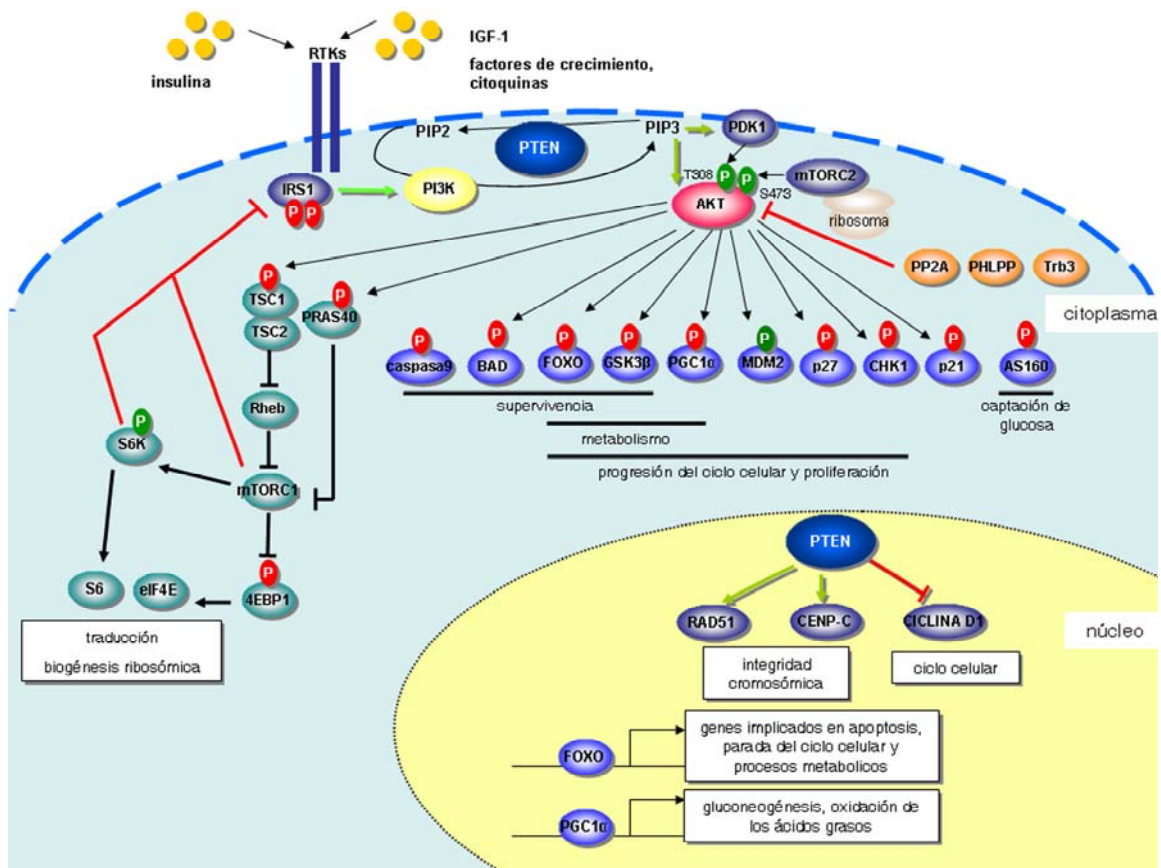
Muchos de los fenotipos asociados a la pérdida de PTEN se pueden explicar por la activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT aunque éste no es siempre el caso. Existen discrepancias entre los modelos animales que pierden PTEN y los modelos animales que tienen sobreexpresión de AKT o PI3K como se revisa en (Blanco-Aparicio et al., 2007). Esto se debe a que PIP3 no solo media su señalización a través de AKT sino que también activa a PDK1, que se considera una quinasa “maestra” ya que se encarga de la fosforilación de residuos críticos de la familia de quinasas AGC como AKT1, 2, 3, SGKs, S6K, PKA, PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ II, PKC $\delta$ , PKC $\zeta$  y RSK.

## 2. Ruta de señalización PI3K/AKT

La ruta de señalización de PI3K/AKT se activa tras múltiples estímulos celulares como factores de crecimiento como IGF1, insulina y citoquinas (**Figura 3**). Cuando estos estímulos llegan a la superficie celular, se activan los receptores tirosina quinasa (RTKs) que activan las fosfatidilinositol-3-quinosas de clase I (PI3K) a través de unión directa o a través de la fosforilación de la proteína de andamiaje (*scaffold protein*) IRS1, la cual se une y activa a PI3K. PI3K fosforila a fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Las proteínas que contienen dominios de homología pleckstrina (PH) transmiten la señalización mediada por el segundo mensajero PIP3 (Engelman et al., 2006). Dos de los miembros mejor caracterizados de este grupo de proteínas son la quinasa AKT y PDK1. AKT se unirá a la membrana junto con PDK1 (Alessi et al., 1997) y PDK1 fosforila a AKT en su residuo T308 del lazo (*loop*) de activación. La desfosforilación de este residuo está mediado por la fosfatasa PP2A (Padmanabhan et al., 2009). Los receptores tirosina quinasa (RTKs) también activan el complejo mTOR 2 (mTORC2, formado por las proteínas mTOR, Rictor, Sin1 y mLST8) promoviendo su asociación con los ribosomas (Zinzalla et al., 2011). mTORC2 fosforila a AKT en el residuo S473 en su motivo hidrofóbico (Sarbasov et al., 2004; Sarbasov et al., 2005). La desfosforilación de este residuo está mediada por la fosfatasa PHLPP (Bayascas and Alessi, 2005; Gao et al., 2005).

La activación de AKT media múltiples procesos celulares como crecimiento celular, metabolismo, supervivencia y homeostasis de la glucosa (Manning and Cantley, 2007).





**Figura 3. Ruta de señalización de PI3K/AKT.** Ver texto para una explicación detallada. Los P en rojo indican fosforilación inhibitoria, los P en verde indican fosforilación activadora.

La activación de AKT ejerce un importante efecto anti-apoptótico al fosforilar e inhibir proteínas como BAD, MDM2 y miembros de la familia de factores de transcripción *Forkhead* (Biggs et al., 1999; Brunet et al., 1999; del Peso et al., 1997; Mayo and Donner, 2001). AKT fosforila a MDM2 en los residuos S166 y S186 lo que promueve la translocación de MDM2 al núcleo, regulando negativamente a p53 (Zhou et al., 2001b). AKT también fosforila a FOXO1 en T24, S256 y S319 y a FOXO3 y FOXO4 en tres sitios equivalentes (Tran et al., 2003) esta fosforilación se traduce en la retención citoplasmática de FOXO impidiendo su función como factor de transcripción. A través de este mecanismo, AKT bloquea los genes que dependen de los factores de transcripción FOXO que favorecen apoptosis, parada del ciclo celular y están implicados en procesos metabólicos.

Dependiendo del contexto celular, AKT se une a FOXO, lo fosforila y lo inhibe, contribuyendo a la homeostasis de la glucosa ya que FOXO promueve la producción de glucosa hepática y regula la diferenciación de células implicadas en el control metabólico (Accili and Arden, 2004). En hepatocitos, AKT al bloquear la función de

FOXO1, inhibe la transcripción de enzimas gluconeogénicas como fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa catalítica, (G6Pc) (Burgering, 2008), también AKT fosforila e inhibe PGC1 $\alpha$  (Li et al., 2007), factor de transcripción que promueve la oxidación de los ácidos grasos y junto a FOXO1, la gluconeogénesis (Puigserver et al., 2003).

Además AKT activa la proliferación celular inactivando los inhibidores de las quinasas de pendientes de ciclina p27 (Fujita et al., 2002) y p21<sup>Cip/WAF1</sup> (Zhou et al., 2001a), e inhibiendo a GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) (Vivanco and Sawyers, 2002).

Adicionalmente, AKT es uno de los más importantes reguladores de un complejo proteico implicado en la traducción proteica y la biogénesis ribosomal. Este complejo es mTORC1 formado por las proteínas mTOR, mLST8 y Raptor. AKT activo, fosforila e inactiva a la proteína activadora de GTPasas (GAP) llamada TSC2 (Dan et al., 2002; Inoki et al., 2002; Potter et al., 2002) que forma un complejo con TSC1 para inhibir a la GTPasa Rheb (*Ras-homolog enriched in brain*) (Garami et al., 2003; Inoki et al., 2003). Rheb-GTP activa el complejo mTORC1 a través de la inhibición de FKBP38, un nuevo regulador negativo de mTORC1 (Bai et al., 2007). Por otro lado, AKT fosforila e inhibe PRAS40 (*proline-rich AKT substrate of 40KDa*) el cual regula negativamente la actividad de mTOR a través de la competición con la GTPasa Rheb (Kovacina et al., 2003). A través de esta doble regulación AKT facilita la activación de la ruta de señalización de mTORC1. mTORC1 fosforila y activa a S6K1 y S6K2 (Guertin and Sabatini, 2007) lo que permite que se active la traducción de proteínas y la biogénesis ribosomal a través de la fosforilación de distintos substratos además de la proteína S6, incluyendo PDCD4, la quinasa eEF2 y eIF4B (Dorrello et al., 2006; Raught et al., 2004; Wang et al., 2001). En este sentido, mTORC1 también fosforila e inactiva a 4EBP1 que a su vez dejará libre al factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) para poder comenzar la traducción de proteínas (Guertin and Sabatini, 2007).

La ruta de señalización de mTORC1 ha sido estudiada en profundidad para poder descubrir tratamientos para muchas enfermedades, sobre todo, después del descubrimiento de un inhibidor específico como la rapamicina, un macrólido extraído del hongo *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina et al., 1975). La rapamicina se une a una proteína intracelular llamada FKBP12, y el complejo rapamicina/FKBP12 bloquea la

actividad de mTORC1 a través de mecanismos todavía no muy claros (Sabatini et al., 1994). La capacidad de la rapamicina para inhibir a mTORC1 ha estimulado su utilización en ensayos clínicos contra varios tipos de cáncer, aunque los resultados de estos ensayos clínicos todavía no están claros (Guertin and Sabatini, 2007).

### 2.1. Regulación de la ruta de señalización de AKT/PI3K.

Además de PTEN, esta ruta de señalización está muy controlada por los componentes que forman parte de ella para asegurar una correcta regulación.

El mecanismo de regulación más estudiado está mediado por mTORC1 y S6K (**Figura 3**). La primera observación de la capacidad de los componentes de la ruta de PI3K de regular la propia activación de PI3K surgió por una serie de estudios que mostraron que la exposición crónica a factores como la insulina, que activan esta ruta de señalización, permite la fosforilación y posterior degradación de la proteína adaptadora IRS1 (Berg et al., 2002; Haruta et al., 2000; Qiao et al., 2002; Tremblay and Marette, 2001; Zhande et al., 2002). Posteriormente se vio que S6K era capaz de fosforilar en los residuos S302 (Harrington et al., 2004) y S1101 (Tremblay et al., 2007) e inhibir IRS1. Esta fosforilación impide que IRS1 se una a los receptores RTKs y se activen. Además, se ha visto que la quinasa mTORC1 fosforila a IRS1 en los residuos S636/639 (Ozes et al., 2001; Tzatsos and Kandror, 2006).

El concepto de que la hiperactivación de mTORC1 resulta en la inhibición de la señalización de PI3K, sugiere que los inhibidores de mTORC1 como la rapamicina pueden tener un efecto adverso y activar la ruta de señalización de PI3K. Se ha demostrado que el tratamiento con rapamicina en pacientes con cáncer activa la ruta de señalización de AKT (O'Reilly et al., 2006), lo que impide usar estos inhibidores para terapia contra el cáncer.

Aunque la ruta más conocida de regulación negativa de la ruta de PI3K es el eje S6K/IRS1, hay otros mecanismos de regulación positiva en el que participan miembros de dicha cascada de señalización. Por ejemplo, los miembros de la familia FOXO pueden inhibir la fosfatasa PP2A lo que aumentaría la fosforilación y activación de AKT (Ni et al., 2007). También se ha estudiado que FOXO1, miembro de la familia de

factores de transcripción FOXO tiene un papel dual en el control de la señalización de la insulina en el hígado, ya que tras la señalización de esta hormona, controla la producción de glucosa y además promueve la síntesis de lípidos y aumenta la sensibilidad a la insulina ya que suprime la expresión de *Trb3* (*pseudokinase tribble-3*) (Matsumoto et al., 2006) que se une a AKT e inhibe la fosforilación de esta proteína mediada tras la estimulación con insulina (Du et al., 2003). También se ha visto que en condiciones de ayuno, FOXO se une a los promotores de los genes *InR* y *IRS2* y activa su transcripción (Puig and Tjian, 2005). Adicionalmente, La inhibición farmacológica de AKT induce la transcripción mediada por FOXO de muchos receptores tirosina quinasa (RTKs) incluyendo el receptor de insulina (*InR*) (Chandarlapaty et al., 2011)

## 2.2. Ruta de señalización de PI3K/ AKT y metabolismo

### 2.2.1 Metabolismo de la glucosa

La ruta de PI3K/ AKT en respuesta a un estímulo extracelular (insulina, factores de crecimiento) regula la captación de nutrientes y el metabolismo de manera específica para cada tejido a través de una serie de efectores. Una de las funciones más importantes de AKT, es estimular la captación de glucosa en respuesta a la insulina. La isoforma de AKT que juega un papel mayor en la regulación del metabolismo de la glucosa es AKT2 (Whiteman et al., 2002b), ya que es la isoforma que se expresa de forma predominante en los tejidos que responden a insulina. Se ha visto asociada al transportador de glucosa 4 (GLUT4) en adipocitos tras la estimulación con insulina (Calera et al., 1998) y la activación de AKT permite la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Kohn et al., 1996) a través de la inhibición de AS160 (Eguez et al., 2005).

Al entrar en la célula, la glucosa se convierte en su forma activa glucosa-6-fosfato que podrá ser acumulada en forma de glucógeno (glucogenogénesis) o catabolizada para generar energía a través de la glucólisis, y se ha visto que AKT puede participar de forma activa en ambos procesos. Dependiendo del contexto celular, la fosforilación la consiguiente la inhibición de FOXO1 por parte de AKT también contribuye a la homeostasis de la glucosa, ya que FOXO1 promueve la producción de glucosa hepática y regula la diferenciación de células implicadas en el control metabólico (Accili and Arden, 2004). En hepatocitos AKT también puede inhibir la gluconeogénesis y la

oxidación de los ácidos grasos a través de fosforilación directa de PGC1 $\alpha$  en S570 (Li et al., 2007) cuya función como coactivador permite regular la transcripción de genes junto a FOXO1 y otros factores de transcripción.

### 2.2.2. Metabolismo de lípidos

La biosíntesis de lípidos es esencial para mantener la homeostasis celular. Los lípidos que produce la célula (glicerol, ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y esfingolípidos) se utilizan como reserva o fuente para construir las membranas celulares, como precursores de otros compuestos celulares y como moléculas de señalización. Defectos en la síntesis o procesamiento de los lípidos contribuyen al desarrollo de muchas enfermedades incluyendo obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, desarrollo de hígado graso, y cáncer.

AKT regula el metabolismo de lípidos a través de la fosforilación e inhibición de GSK3, lo que produce la estabilización de SREBP y favorece la síntesis de lípidos (Sundqvist et al., 2005).

Recientemente, además del papel clave que juegan en el crecimiento celular y la síntesis de proteínas, se ha otorgado un papel muy importante a mTORC1 en el control de la síntesis de lípidos a través de SREBP-1, PPAR- $\gamma$  y Lipin1 (Laplanche and Sabatini, 2009).

### 2.2.3. Obesidad y diabetes

El exceso de nutrientes debido a un aumento en la ingesta de carbohidratos, proteínas o grasa lleva al desarrollo de la obesidad. La activación de la ruta de señalización mTORC1/S6K por nutrientes ha recabado especial interés por sus implicaciones en obesidad y resistencia a la insulina. Estudios han demostrado que los ratones que no tienen S6K1 exhiben una mayor lipólisis, un reducido tejido adiposo y además estos ratones están protegidos por el daño metabólico producido por una dieta rica en grasas (Um et al., 2004). Además, también se ha comprobado que S6K/mTORC1 tienen un papel fundamental en la desensibilización de la ruta de PI3K/AKT tras la exposición crónica a insulina (obesidad y envejecimiento) a través de la fosforilación e inhibición de IRS1 (Um et al., 2006).

## 2.3. Papel de la ruta de señalización de la insulina en longevidad.

El envejecimiento es un proceso complejo por el que se acumulan varios tipos de daño tanto a nivel molecular, celular y de tejido. A pesar de esta complejidad, en los últimos años, muchos estudios han demostrado que la dieta (en forma de restricción calórica), algunas drogas (rapamicina en mamíferos y otros compuestos como el resveratrol en otros organismos pero no en mamíferos) y modificaciones genéticas pueden aumentar la longevidad en multitud de organismos.

Muchas de las alteraciones genéticas que hacen a los animales más longevos están relacionadas con una disminución de las rutas de señalización de IGF1 (*insulin-like growth factor*)/insulina (abreviada IIS), y de TOR (*target of rapamycin*) ya que podrían inducir un estado fisiológico similar al que resulta de periodos de escasez de nutrientes.

### 2.3.1. Ruta de señalización de IGF1/insulina

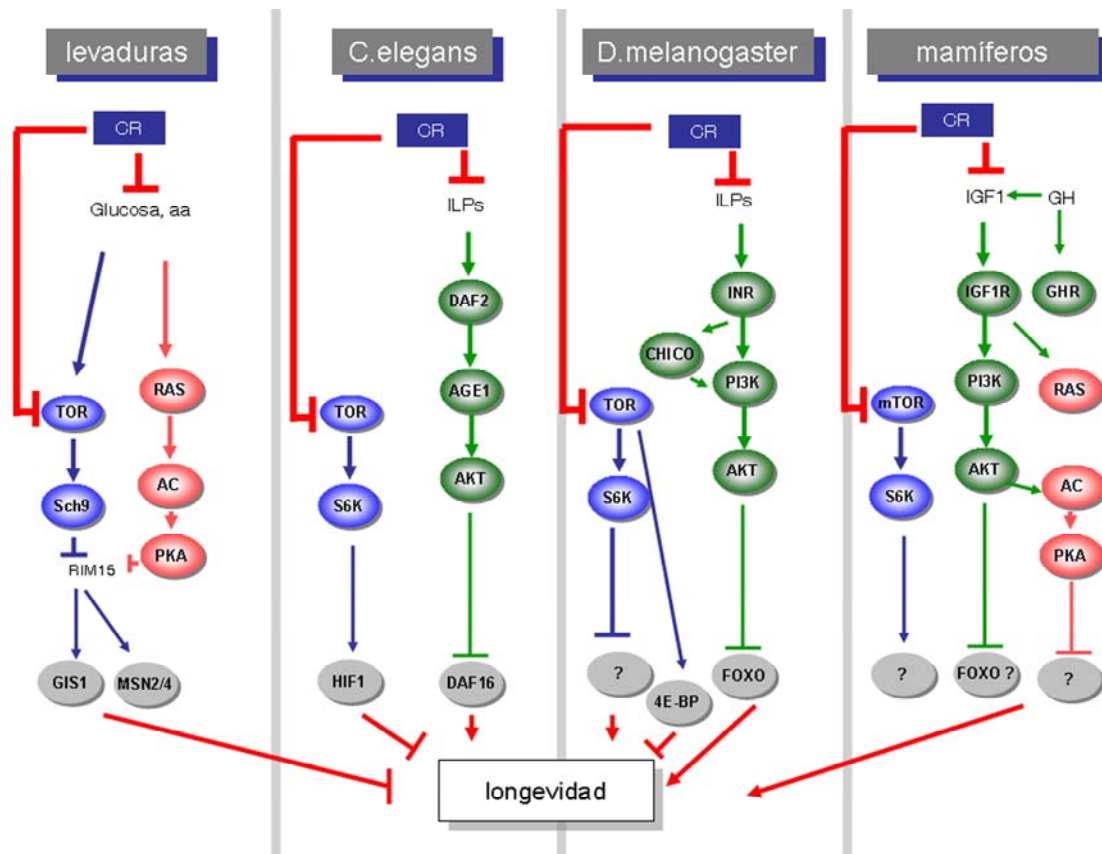
La reducción de la actividad de la ruta de señalización de la IGF/insulina (IIS) es una de las vías que aparecen alteradas en animales longevos.

El organismo *C. elegans* produce más de 30 péptidos parecidos a la insulina (ILPs, *insulin-like peptides*) que señalizan a través del receptor daf-2. Daf-2 conserva buena homología con el gen de mamíferos que codifica para el receptor de IGF1 (*insulin-like growth factor1 receptor*). La activación de daf-2 conduce a la activación de algunas quinasas lo que retienen en el citoplasma al factor de transcripción daf-16 (homólogo de FOXO). La reducción de esta ruta de señalización debido a una disminución de estos péptidos (ILPs) o mutaciones en daf-2 y en sus efectores, permiten que daf-16 se dirija al núcleo. En el núcleo, daf-16 activa un programa transcripcional que permite un aumento de la resistencia al estrés y un aumento de la longevidad. Por tanto, la longevidad del organismo derivada de la reducción de esta señalización, requiere al factor de transcripción FOXO (daf-16) implicado en la respuesta celular al estrés, actividad antimicrobiana y detoxificación de radicales libres y xenobióticos (Johnson, 2008). La reducción de la ruta IIS en tejidos específicos ha revelado que el sistema nervioso y el intestino, que incluye el tejido graso del nematodo, son importantes para el aumento de la longevidad. La ruta de señalización de daf-2 está regulada por daf-18,



gen ortólogo de PTEN en humanos. La sobreexpresión de daf-18 conduce a un aumento de la longevidad (Masse et al., 2005).

En *D. melanogaster*, estudios sobre el control genético del envejecimiento han revelado un importante papel de la ruta de la señalización IGF1/insulina que además está muy conservada en mamíferos puesto que se han encontrado al menos 8 péptidos parecidos a la insulina (ILPs), receptores comunes, homólogos de IRS, quinasas y factores de transcripción como FOXO (Toivonen and Partridge, 2009). Mutaciones en el receptor de insulina o su sustrato (Chico) tienen como consecuencia que haya menos señalización de esta ruta lo que se traduce en una resistencia al estrés y un marcado aumento en la longevidad (Clancy et al., 2001; Piper et al., 2008).



**Figura 4. Rutas de señalización de nutrientes implicadas en envejecimiento en levaduras, nematodos, moscas y mamíferos.** El papel de TOR y S6K en promover envejecimiento parece conservado en los 4 grupos de organismos. Sin embargo, la ruta AC-PKA, parece ser que solo promueve el envejecimiento en levaduras y mamíferos. La ruta de señalización IGF1/insulina y GH (en mamíferos) acelera el envejecimiento en nematodos, moscas y mamíferos. Los factores de transcripción (GIS1, MSN2/4, DAF16, FOXO) que son inactivados por las rutas TOR/S6K, AC/PKA participan en la protección celular y el envejecimiento en nematodos, moscas; en mamíferos todavía no se ha demostrado. La restricción calórica inhibe de manera directa (levaduras) o indirecta (nematodos, moscas y mamíferos) al reducir los niveles circulantes de factores como IGF1 e insulina. Figura basada en (Fontana et al., 2010)

Los modelos animales invertebrados han servido como herramientas para descubrir genes y mecanismos implicados en longevidad, pero el ratón es el mamífero más práctico para establecer si los genes homólogos pueden aumentar la longevidad.

Como en organismos invertebrados, en ratón la reducción de la ruta de señalización IGF1/insulina puede también extender la longevidad. Mutaciones que interfieren con la biosíntesis de la hormona del crecimiento (GH), acciones de dicha hormona, o sensibilidad a IGF1, permiten que haya una extensión en la longevidad de estos ratones. El aumento en la longevidad media de estos mutantes va desde 20%-70% dependiendo de la naturaleza del defecto endocrino, género, dieta o fondo genético de la cepa de ratón. El aumento de longevidad en estos ratones viene dado por múltiples mecanismos que incluyen reducción de los niveles de insulina, aumento de la sensibilidad a la insulina, alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, reducción en la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), resistencia a estrés, reducción del daño oxidativo y reducción de enfermedades asociadas al envejecimiento.

En la tabla que se muestra a continuación, se detallan algunos de los modelos de ratón que tienen una disminución de señalización de esta ruta y sus principales fenotipos (Bartke, 2005; Selman and Withers, 2011).

| Nombre                              | Origen   | Efecto   | Fenotipos  | Aumento en longevidad  |
|-------------------------------------|--|--|--|--|
| Ames dwarf; df; Prop <sup>df</sup>  | Mutación espontánea (Schaible and Gowen, 1961) | Fallo en la diferenciación de somatotrofos, lactotrofos y tirotrofos, deficiencia en GH, PRL y TSH | Crecimiento y tamaño corporal reducido. No se detectan niveles en plasma de GH, PRL, TSH e IGF1. Reducción en los niveles de hormonas tiroideas, insulina y glucosa, esterilidad en las hembras, daño oxidativo reducido | 35-70% dependiendo del género y dieta (Bartke et al., 2004; Brown-Borg et al., 1996) |
| Snell dwarf; dw; Pit1 <sup>dw</sup> | Mutación espontánea (Snell, 1929)              |  |  | 42% (Flurkey et al., 2001)   |
| Little lit; GHRHR <sup>li</sup>     | Mutación espontánea (Eicher and Beamer, 1976)  | Resistencia a GHRH; supresión de la liberación de GH   | Crecimiento y tamaño corporal reducido. Aumento progresivo de la adiposidad  | 24% (sólo cuando están bajo una dieta pobre en grasas) (Flurkey et al., 2001)        |
| GHR/GHBP-KO;                        | Alteración del gen específico                  | Ausencia del receptor de GH y su proteína de unión. Resistencia                                    | Crecimiento y tamaño corporal reducido. Reducción en plasma de   | 40-55% en fondo genético heterogéneo; 26%  |



| Nombre               | Origen   | Efecto  | Fenotipos   | Aumento en longevidad  |
|----------------------|--|---|---|--|
| Laron Dwarf; GHR-KO  | (Zhou et al., 1997)  | a la señalización de GH   | IGF1, insulina y glucosa. Aumento de la adiposidad, reducción de la fertilidad                        | en machos C57BL/6(Coschigano et al., 2000; Coschigano et al., 2003)            |
| IGFIR <sup>+/-</sup> | Alteración del gen específico (Holzenberger et al., 2003)                  | Reducción del número de receptores de IGF1, resistencia parcial a IGF1      | Fertilidad normal, ligera disminución del peso corporal, aumento a la resistencia al estrés oxidativo | 33% en hembras (Holzenberger et al., 2003)                                     |
| FIRKO                | Alteración del gen específico (Bluher et al., 2002)                        | Eliminación del receptor de insulina en el tejido graso                     | Reducción de la adiposidad y disminución del peso corporal; mejor sensibilidad a la insulina          | 18% (Bluher et al., 2003)  |
| IRS1-KO              | Alteración del gen específico (Tamemoto et al., 1994)                      | Ausencia de sustrato del receptor de insulina 1                             | Hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa y retraso en el crecimiento                               | 8% en machos y 32% en hembras (Selman et al., 2008a)                           |
| IRS2 <sup>+/-</sup>  | Alteración del gen específico (Withers et al., 1999; Withers et al., 1998) | Reducción de la expresión del sustrato del receptor de la insulina 2        | Disminución del tamaño de los islotes pancreáticos, leve intolerancia a la glucosa                    | 17% (Taguchi et al., 2007)<br>No aumento de longevidad (Selman et al., 2008a)* |
| bIRS2 <sup>-/-</sup> | Alteración del gen específico (Taguchi et al., 2007)                       | Ausencia de expresión del sustrato del receptor de la insulina 2 en cerebro | Reducción del tamaño del cerebro, hiperinsulinemia, aumento de los islotes pancreáticos               | 14% (Taguchi et al., 2007)   |

**Tabla2. Modelos de ratón que tienen la ruta IIS disminuida.**

\*En dos estudios de envejecimiento separados utilizando la misma colonia de ratones se han visto resultados diferentes. Se discute en (Selman et al., 2008b)

### 2.3.2. Otras rutas implicadas en metabolismo y envejecimiento

#### Restricción calórica

La restricción calórica es un régimen alimentario que se caracteriza por una moderada reducción en el porcentaje calórico que naturalmente consumiría, pero manteniendo una nutrición adecuada, sin llegar a la malnutrición. Se ha demostrado que la restricción calórica alarga la vida en muchos organismos como levaduras (*S. cerevisiae*) (Jiang et al., 2000; Lakowski and Hekimi, 1998), moscas (*D. melanogaster*) (Mair et al., 2003), nematodos (*C. elegans*) (Lakowski and Hekimi, 1998), roedores (Weindruch and Walford, 1982) y monos (Anderson et al., 2009). Los efectos beneficiosos de la restricción calórica proceden de una ingesta reducida de azúcares y proteínas. La

restricción calórica también retrasa las enfermedades asociadas al envejecimiento en roedores y monos (Anderson et al., 2009), y en humanos reduce el riesgo de padecer diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Fontana and Klein, 2007).

Otras proteínas implicadas en la regulación del estado nutricional y consumo de energía y que se han relacionado con longevidad y envejecimiento son las sirtuinas. Las sirtuinas son una familia de proteínas conservadas a lo largo de la evolución. La primera sirtuina que se caracterizó fue Sir2 (*silent information regulator 2*) de la levadura *S.cerevisiae*; al sobreexpresar Sir2 en este organismo (Kaeberlein et al., 1999) se ha demostrado que aumenta su longevidad. En otros organismos no mamíferos como *C.elegans* también se ha demostrado que la sobreexpresión de sir2-1 (homólogo del gen de levaduras sir2) alarga la vida en este nematodo (Tissenbaum and Guarente, 2001). En *D. melanogaster*, una copia extra del gen Sir2 (dSir2) expresado de forma ubicua hace aumentar la longevidad de este organismo (Rogina and Helfand, 2004). En mamíferos, existen 7 parálogos del gen Sir2, siendo el más parecido, Sirt1 (Michan and Sinclair, 2007). Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Herranz et al., 2010) indican que la sobreexpresión de Sirt1 en ratón no tiene un efecto en longevidad aunque los ratones que poseen una sobreexpresión de esta proteína están protegidos frente al daño metabólico inducido por una dieta rica en grasa (Pfluger et al., 2008), de la osteoporosis, diabetes y cáncer.

Como en levaduras (Wei et al., 2009), nematodos, (Hansen et al., 2008; Johnson, 2008) o moscas (Bjedov et al., 2010; Kapahi et al., 2004), recientemente se ha visto en mamíferos que la inhibición de la ruta de señalización de mTORC1 ya sea mediante el tratamiento con su inhibidor, rapamicina (Harrison et al., 2009) o por delección de la quinasa ribosomal S6 (S6K1) (Selman et al., 2009), aumenta la longevidad de los ratones y reduce la incidencia de patologías relacionadas con el envejecimiento como la osteoporosis, fallo del sistema inmune, disfunción motora o resistencia a la insulina.

Recientemente, en levaduras se ha visto que la reducción de la señalización de 3 proteínas Ras, adenilato ciclasa (AC) y proteína quinasa A (PKA) también están implicadas en el aumento de la longevidad. Los niveles de superóxido aumentan durante el envejecimiento de la levadura y éstos se han visto reducidos en los organismos longevos deficientes en Ras-AC-PKA (Fabrizio et al., 2001; Lin et al., 2000).

En ratones, la eliminación de la adenilil-ciclasa tipo 5 (AC5) cuya expresión predomina en cerebro y corazón, aumenta la resistencia al estrés y la longevidad (Yan et al., 2007).

### 3. El tejido adiposo marrón (BAT).

El tejido adiposo marrón (BAT, del inglés *brown adipose tissue*) es el encargado de transformar nutrientes en calor y permitir mantener la temperatura corporal sin temblar (*non-shivering thermogenesis*). La producción de calor ocurre en la mitocondria de los adipocitos marrones a través de la proteína desacoplante UCP1. Esta proteína es un transportador de protones presente en la membrana mitocondrial y desacopla el proceso de respiración mitocondrial de la producción de ATP, translocando los protones desde el citoplasma hasta el interior de la mitocondria, un proceso que genera calor y no ATP. Este mecanismo es esencial para regular la temperatura corporal (Enerback et al., 1997) y es además importante para el control de la obesidad (Feldmann et al., 2009). El tejido adiposo marrón se localiza en

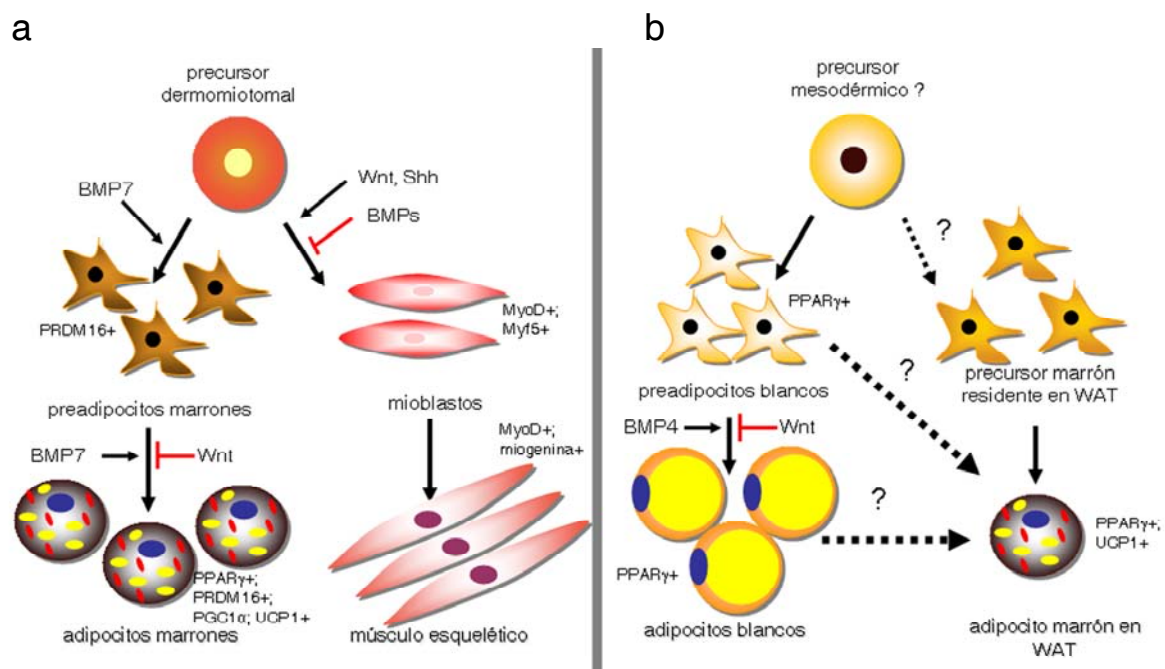
#### 3.1. Origen del tejido adiposo marrón

El tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*) y el tejido adiposo marrón tienen características comunes por lo que en un principio se asumió que procedían de un mismo progenitor celular. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que tienen orígenes distintos. Los adipocitos marrones se localizan en el tejido adiposo marrón o entremezclados entre el tejido adiposo blanco. Estas dos poblaciones de adipocitos marrones tienen un origen distinto:

- En el caso de los adipocitos marrones que forman el BAT, proceden del mismo linaje celular que el tejido muscular (**Figura 5**). Específicamente, los adipocitos marrones y el tejido muscular proceden del dermomiótomo que expresa *Engrailed-1* (En-1) (Atit et al., 2006) y *Myf5* (Seale et al., 2008). Adicionalmente se ha visto que los precursores del tejido adiposo marrón y no los del tejido adiposo blanco expresan un patrón genético parecido a las células del músculo (Timmons et al., 2007). Recientemente se ha demostrado que el patrón proteómico mitocondrial del BAT está muy relacionado con el del tejido muscular pero no con el WAT (Forner et al., 2009).

Otro de los factores que están implicados en el desarrollo del tejido marrón es PRDM16 y su cofactor C/EBP $\beta$ . Este complejo transcripcional actúa en los precursores mioblásticos Myf5 positivos o en preadipocitos induciendo la expresión de PPAR $\gamma$  y PGC1 $\alpha$ , que inducen el programa de diferenciación del adipocito marrón (Kajimura et al., 2009).

- Los adipocitos marrones también se pueden localizar entremezclados con los adipocitos blancos en el tejido adiposo blanco después de una exposición continuada al frío o por estimulación nerviosa  $\beta_3$ -adrenérgica. Estos adipocitos marrones tienen un precursor diferente al de los adipocitos marrones localizados en el BAT; queda por verificar si derivan de un preadipocito blanco, un adipocito blanco maduro o de células madre del tejido adiposo blanco que den lugar a este tipo de adipocitos marrones (Kajimura et al., 2010). Ya hay algunos grupos de investigación que apunta a que estos adipocitos marrones proceden de la transdiferenciación de los adipocitos blancos (Barbatelli et al., 2010).



**Figura 5. Origen y desarrollo del tejido adiposo marrón.** El tejido adiposo marrón (BAT) y el tejido adiposo blanco (WAT) tienen orígenes celulares distintos. **a.** Los adipocitos marrones que se encuentran en el tejido adiposo marrón proceden, al igual que músculo esquelético, de precursores que expresan Myf5 y En1. La ruta de señalización de Wnt impide que los preadipocitos maduren a adipocitos marrones y se diferencien a precursores musculares. PRDM16, PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$  y UCP1 son genes que se expresan en los adipocitos marrones maduros. **b.** Todavía no se conocen bien las células madre que dan lugar al tejido adiposo blanco. Los preadipocitos blancos que expresan PPAR $\gamma$  se diferencian a adipocitos blancos en un proceso que parece que es estimulado por ciertos factores BMPs. Los adipocitos marrones que se localizan en el tejido adiposo blanco tras la estimulación continuada de la ruta  $\beta_3$ -adrenérgica no descenden de células Myf5+. Estas células pueden derivar de precursores de adipocitos marrones que no expresan Myf5+, diferenciarse directamente de los precursores

preadipocíticos o transdiferenciación de los adipocitos blancos. Las flechas discontinuas indican relación precursor-producto hipotético. Figura adaptada de (Kajimura et al., 2010).

### 3.2. Función del tejido adiposo marrón

El mecanismo más eficiente para disipar energía es a través de los adipocitos marrones que se sitúan en tejido adiposo marrón (BAT; *brown adipose tissue*) y muchas veces aparecen entre los adipocitos blancos (Kozak and Anunciado-Koza, 2008; Nedergaard and Cannon, 2010).

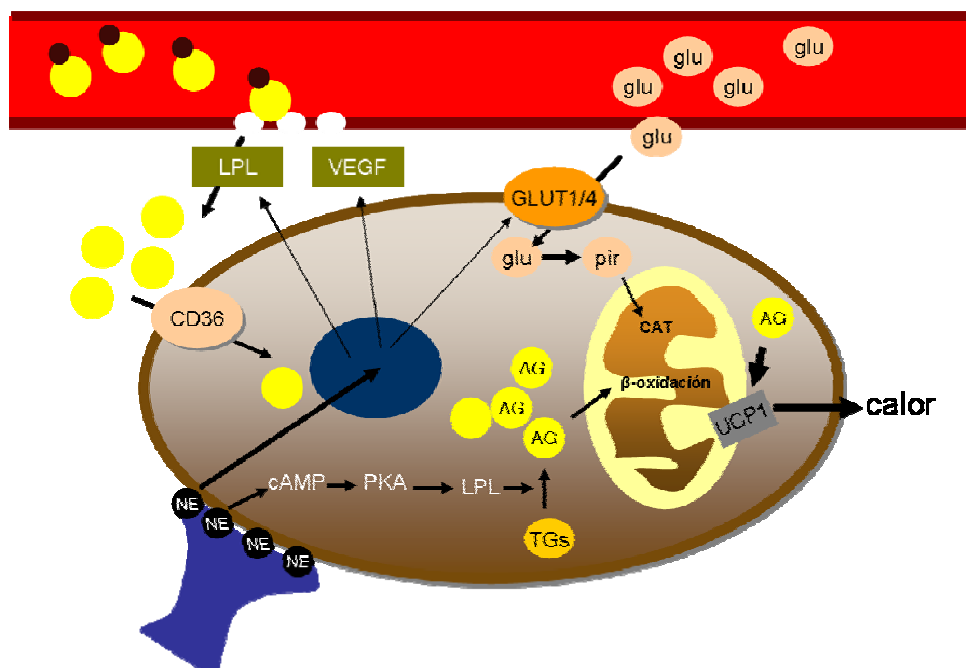
El tejido adiposo marrón está muy vascularizado y sus células contienen multitud de gotas lipídicas y mitocondrias. La exposición al frío o a un exceso de nutrientes (termogénesis inducida por la dieta) hace que el sistema nervioso simpático, que inerva directamente a los adipocitos marrones, libere norepinefrina al tejido adiposo marrón y ésta a su vez activa los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos para estimular la lipólisis y la producción de calor (Rousset et al., 2004). Los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos, activan las proteínas Gs que unen GTP lo que activa a la adenilato ciclasa (AC) que genera adenosina monofosfato cíclico (cAMP). El cAMP activa a la proteína quinasa A (PKA) que fosforila y activa a las lipasas que convierten los triglicéridos (TGs) en ácidos grasos (AG). Estos ácidos grasos son transferidos a la mitocondria donde se produce la  $\beta$ -oxidación para generar acetil-CoA el cual entra el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). Como resultado de estos dos procesos, se genera FADH y NADH. Cuando UCP1 se activa por esta ruta, media el flujo de protones que desacopla la cadena de transporte de electrones produciendo calor (**Figura 6**).

Para la termogénesis, el BAT primero utiliza como sustrato los lípidos acumulados. Esta fase de la termogénesis corresponde molecularmente a la señalización por norepinefrina que permite la liberación de los ácidos grasos procedentes de los triglicéridos (TGs) acumulados en las gotas de lípidos. Algunos de estos ácidos grasos activan a UCP1, y los demás se importan en la mitocondria y se queman, pero debido a que los lípidos acumulados sólo pueden mantener la termogénesis durante un periodo corto, es necesario que otros tejidos proporcionen la fuente de energía.

En un reciente estudio, se ha visto que el tejido adiposo marrón es capaz de importar y quemar triglicéridos procedentes de la sangre (Bartelt et al., 2011). Mientras que la

norepinefrina activa la liberación de los ácidos grasos, también induce a VEGF (Fredriksson et al., 2005) y la expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) (Bartelt et al., 2011; Mitchell et al., 1992). VEGF aumenta la permeabilidad capilar, permitiendo que los TGs abandonen los capilares. La LPL degrada los triglicéridos y permite que los ácidos grasos estén disponibles para su combustión a través de la proteína transportadora de membrana CD36 (**Figura 6**). En este estudio también demuestran que el BAT consume una cantidad de glucosa similar a la del hígado en condiciones de temperatura y dieta normales y de hecho el descubrimiento de que el humano adulto posee BAT activo procede de la utilización de desoxiglucosa marcada radiactivamente con flúor ( $^{18}\text{F}$ -FDG) en la tomografía de emisión de positrones (PET).

La actividad y expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 también se ha visto aumentada cuando se somete a los ratones a frío y a estimulación con noradrenalina (Bartelt et al., 2011; Dallner et al., 2006; Nikami et al., 1992). La glucosa que no se quema inmediatamente se guarda en forma de glucógeno y posteriormente se convierte en lípidos para reponer los TGs consumidos (**Figura 6**).



**Figura 6.** Papel del tejido adiposo marrón en el metabolismo de ácidos grasos y glucosa como fuente de energía para producir calor. Ver detalles en el texto. LPL: lipoproteína lipasa; AG: ácidos grasos; Glu: glucosa; TGs: triglicéridos.

### 3.3. El tejido adiposo marrón en humanos

La hipótesis general hasta hace unos años planteaba que los recién nacidos poseen depósitos de tejido adiposo marrón principalmente en la región axilar y cervical (Lean and James, 1986), pero al ir creciendo esos depósitos se reducían hasta desaparecer, con lo que los humanos adultos no poseerían tejido adiposo marrón activo; aunque esto siempre se ha discutido ya que muchas veces se encontraban en estudios post-mortem depósitos de este tejido aunque el número de estos depósitos de tejido adiposo marrón disminuían con la edad (Heaton, 1972). También se ha observado que en trabajadores expuestos a frío tienen un mayor número de depósitos de tejido adiposo marrón comparado con el resto de la población (Huttunen et al., 1981). Pacientes con feocromocitomas, un tumor raro que se origina en la células que secretan catecolaminas de la glándula adrenal tienen tejido adiposo marrón abundante (English et al., 1973) al igual que los pacientes que han desarrollado hibernomas (tumores benignos del tejido adiposo marrón) (Sutherland et al., 1952)

El interés en el estudio de este tejido ha aumentado en los dos últimos años gracias a varias publicaciones del año 2009 en las que por tomografía de emisión de positrones (PET) se descubrió que los humanos adultos tienen tejido adiposo marrón activo y su actividad depende de la edad, la adiposidad, la temperatura y el género (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Basados en estos estudios y en análisis postmortem podemos situar el tejido adiposo marrón activo alrededor del tiroides y tráquea, en el mediastino, en la zona paracervical/supraclavicular, zona paratorácica zona supra y perirrenal.

La existencia de un tejido adiposo marrón activo en el individuo adulto es muy importante ya que ofrece la posibilidad de regular el gasto energético. Un aumento en el gasto energético sería muy atractivo como terapia frente a la obesidad y a las enfermedades asociadas a dicha enfermedad, como la diabetes tipo 2 frente a otras terapias que no han tenido el éxito esperado, como pueden ser la reducción de la ingesta o la cirugía.

## **OBJETIVOS**





## Objetivos

1. Generación de líneas de ratón que sobreexpresen el supresor de tumores Pten de manera sistémica mediante la utilización de Cromosomas Artificiales de Bacterias y conservando la misma regulación que el gen endógeno
2. Estudio de la funcionalidad del transgén y caracterización del modelo animal
3. Estudio del impacto de la sobreexpresión de Pten en metabolismo
4. Estudio del impacto de la sobreexpresión de Pten en envejecimiento y enfermedades asociadas



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Generación del ratón transgénico

Para la generación del ratón transgénico, se utilizó el Cromosoma Artificial de Bacterias (BAC) llamado RP24-372O16 procedente de CHORI (<http://www.chori.org>) clonado en el vector pTARBAC que contiene la secuencia genómica de Pten. Se linearizó con la enzima de restricción PI-SCeI (*New England Biolabs*) y se microinyectaron 2 pl de una solución que contenía 0,4 µg/µl de BAC en oocitos fertilizados procedentes de cruces de ratones [C57BL6 x CBA]F1. Los ratones que derivaron de esta microinyección se genotiparon por PCR para las regiones terminales del BAC para comprobar que el transgén se había integrado. Posteriormente se cruzaron con ratones C57BL6 y las crías se genotiparon por PCR para comprobar la transmisión del transgén. Los oligonucleótidos utilizados para las PCRs para comprobar la inserción y la transmisión del transgén se detallan en la **Tabla 3** de este mismo apartado. Se seleccionó una línea que transmitía el transgén y se expandió la línea cruzándolos entre ellos, por lo que los animales objeto de estudio de esta tesis son C57BL6/CBA (75%:25%)

## 2. Experimentación animal

Los animales fueron alimentados con dieta estándar (Harlan Teklad 2018, 18% calorías procedentes de grasa) o cuando se indique con una dieta rica en grasa (*Research Diets* D12451, 45% de calorías procedentes de grasa). Los animales se observaron semanalmente por personal entrenado. Al observar signos de morbilidad, los animales se vigilaron diariamente hasta la aplicación del punto final humanitario (*human end point*, HEP; <http://dels.nas.edu/global/ilar/Guide>). Este punto final humanitario se aplica cuando la esperanza de vida del ratón no llega a una semana. Los ratones que murieron espontáneamente (DIC, *dead in cage*) se debe a una muerte repentina sin que previamente se observaran signos de morbilidad.

### 2.1. Carcinogénesis inducida por 3-metilcolantreno

Para inducir fibrosarcomas en los ratones, se utilizó el carcinógeno 3-metilcolantreno (Matheu et al., 2007; Matheu et al., 2004). Para ello, se utilizaron ratones de 2 meses de edad y se inyectó intramuscularmente en la pata trasera izquierda 100 µl de una solución de 3-metilcolantreno (*Sigma*) a una concentración de 100 µg/µl

disuelta en aceite de sésamo (*Sigma*). Los ratones fueron sacrificados cuando el tumor llegó a medir 1,5cm de diámetro.

## 2.2. Caracterización metabólica

### 2.2.1. Ensayo de cajas metabólicas

Para este ensayo se sustituyó la caja normal por cajas metabólicas en las que se puede monitorizar la ingesta de agua y comida y la excreción de heces y orina. Los ratones estuvieron en estas cajas durante un día para habituarse y posteriormente se midió durante 4 días la ingesta y la excreción. Para este ensayo se utilizaron 8 machos de cada genotipo de 4 meses de edad.

### 2.2.2. Medidas de adiposidad y de densidad ósea

Se realizó por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA, *Dual energy X-ray absorptiometry*; Densitómetro Lunar PIXImus, *GE Medical Systems*). La adquisición de la imagen duró 5 minutos en los que el ratón está anestesiado por inhalación de 2% de isoflurano en oxígeno. El análisis del tejido graso y magro se determina seleccionando una región de interés que abarca el cuerpo entero excluyendo el cráneo y la masa ósea. El análisis de la densidad ósea se determina seleccionando una región de interés que abarca el fémur de la pata derecha del ratón.

### 2.2.3. Estudios de calorimetría indirecta

Los estudios de calorimetría indirecta se hicieron siguiendo métodos estándar utilizando cámaras metabólicas Oxylet System (*Panlab Harvard Apparatus*). Los ratones estuvieron 12 horas previas a la medida en las cajas de estudio para su adaptación. La temperatura de la sala fue 23°C y los ciclos de luz/oscuridad fueron de 12h cada uno. El O<sub>2</sub> consumido (VO<sub>2</sub>) y el CO<sub>2</sub> eliminado (CO<sub>2</sub>) fue monitorizado cada 24 minutos (4 cajas de medida consecutivas, con un periodo de medición de 4 minutos en cada caja mas un minuto entre caja y caja para la limpieza y purga del sistema). El cociente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*) fue calculado según la fórmula  $RQ = VCO_2 / VO_2$ . El gasto energético (EE, *energy expenditure*) fue calculado según la fórmula:  $EE = (3,815 + (1,232 \times RQ)) \times VO_2 \times 1,44$ ). La tasa metabólica basal (RMR, *resting metabolic rate*) fue calculada como la media de las tres medidas de VO<sub>2</sub> más bajas (Feldmann et al., 2009). Para calcular la tasa metabólica basal a termoneutralidad (30°C) los animales se

aclimataron a esta temperatura durante una semana y se introdujeron en las cajas metabólicas a las 9:00, en ausencia de comida y bebida. Se registraron medidas de  $\text{VO}_2$  y  $\text{CO}_2$  hasta las 17:00 pero solo se consideraron las 3 últimas horas (de 14:00-17:00) para calcular la media de los tres valores más bajos de  $\text{VO}_2$ .

#### 2.2.4. Estudios de actividad y medida de temperatura corporal

La actividad se midió utilizando *Physiocage System* (Panlab Harvard Apparatus) durante 48 horas. La actividad locomotora se determinó utilizando un sistema multidimensional de luz infrarroja con haces de luz instalados en la parte superior e inferior de las jaulas, expresándose la actividad por las interrupciones en los haces de luz.

Para medir la temperatura corporal, se implantaron transmisores de telemetría (PhysioTel®TA-F10, *Data Sciences International, DSI*) en la cavidad peritoneal de los ratones. La temperatura fue registrada cada 2 minutos a 23°C durante 72h.

#### 2.2.5. Test de tolerancia a la glucosa y a la insulina

Para el test de tolerancia a la glucosa (GTT), los ratones estuvieron toda la noche en ayunas; al día siguiente fueron inyectados intraperitonealmente con 2g/kg de glucosa (*Sigma*); y los niveles de glucosa se miden a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. El test de tolerancia a la insulina (ITT) se hizo sin ayuno previo; en este caso se inyectó intraperitonealmente 0,75IU/kg de insulina (Eli Lilly and Co., Humalog Insulin). Y se determinan los niveles de glucosa a 0, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos.

#### 2.2.6. Captación de glucosa por tomografía de emisión de positrones (PET, positron emission tomography)

Las medidas se realizaron por la mañana en ratones no ayunados previamente. El análisis se realizó siguiendo métodos optimizados (Mulero et al., 2011). Los ratones fueron anestesiados con un flujo continuo de una mezcla de 1%-3% de isoflurano con oxígeno (2l/min) y fueron inyectados por vía intravenosa con un volumen de 100  $\mu\text{l}$  que contenía 500  $\mu\text{Ci}$  de  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxiglucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG). Posteriormente se dejó al ratón consciente y a 23°C para la distribución de la glucosa marcada durante 45 minutos. Para la adquisición de la imagen, los ratones fueron anestesiados siguiendo el protocolo previamente descrito y las imágenes fueron adquiridas utilizando eXplore Vista PET (GE Healthcare). Se dibujó el tejido adiposo marrón como un volumen de



interés (VOI, *volume of interest*) y se cuantificaron las cuentas totales de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Para medir el Valor de Captación Estandarizado (SUVave, *standardized uptake value average*) se utilizó la siguiente fórmula:  $\text{SUVave} = [\text{captación (MBq)} / \text{volumen de VOI (cc)}] / [\text{peso del ratón (g)} \times \text{18F-FDG dosis inyectada (MBq)} \times \text{factor de calibración}]$

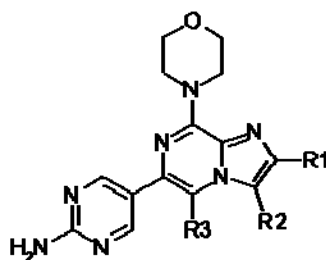
#### 2.2.7. Análisis de metabolitos en sangre y suero.

Los niveles de IGF1 en suero fueron medidos por ELISA (*Mouse/Rat IGF-1 ELISA*, Demeditec) después de la obtención de sangre por punción en la vena submandibular del ratón.

Los niveles de glucosa en sangre fueron determinados tras 16 horas de ayuno utilizando una gota de sangre de la cola y midiendo los niveles de glucosa con un glucómetro (A. Meranini *Diagnosis*). Los niveles de insulina en condiciones de ayuno (16h) fueron medidos tras la recogida de sangre de la cola y posterior extracción del suero. Con este suero se midió la insulina utilizando un kit de ELISA (*Crystal Chem Inc.*). La resistencia a la insulina fue evaluada utilizando el índice HOMA-IR (*homeostatic model assessment index*). Este índice se calcula siguiendo la fórmula  $\text{HOMA-IR} = [\text{glucosa en ayunas (mg/dl)} \times \text{insulina en ayunas (}\mu\text{U/ml)}] / 405$ . La sensibilidad a la insulina fue medida con el índice QUICKI (*quantitative insulina sensitivity check index*). Este índice se calcula siguiendo la fórmula  $\text{QUICKI} = 1 / [\text{Log}(\text{insulina en ayuno, (}\mu\text{U/ml)}) + \text{Log}(\text{glucosa en ayuno (mg/dl)})]$ .

### 2.3. Experimentos *in vivo* con los inhibidores de PI3K

El inhibidor de PI3K desarrollado en el CNIO (Compuesto A) (**Figura 6**) está protegido por la patente WO2010/119264 (los archivos es están disponibles en la Organización Mundial de la Propiedad intelectual (*Word Intellectual Property Organization*; <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2010119264>)). En resumen, es un potente inhibidor específico de la actividad quinasa de las isoformas p110 $\alpha$  ( $K_i=2.4\text{nM}$ ) y p110 $\delta$  ( $K_i=9,8\text{nM}$ ). La inhibición de las otras isoformas de PI3K (p110 $\beta$  y p110 $\gamma$ ) tienen valores de  $K_i>100\text{nM}$ . La inhibición de otras 282 quinasas incluyendo mTOR y DNAPK requieren concentraciones de  $\text{IC}_{50}>1\mu\text{M}$ .



**Figura 7.** Estructura química del Compuesto A

Para el tratamiento de 6 horas, el Compuesto A fue administrado oralmente por sondaje a una dosis de 15mg/kg. El compuesto A fue disuelto en 10% N-metil-2-pirrolidona ácida (NMP pH=3,21) y 90% Polietilenglicol 300 (PEG 300, *Sigma*). Esta misma solución fue utilizada como vehículo. Pasadas las 6h, los animales fueron sacrificados y los tejidos fueron procesados. Se utilizaron 3 machos C57BL6 por grupo experimental de tres meses de edad.

Para el tratamiento de dos semanas en animales obesos, el compuesto A fue administrado oralmente por sondaje a una concentración de 10mg/kg o 15mg/kg, una vez al día, cuatro veces a la semana durante dos semanas. Para este experimento también se utilizó el inhibidor de PI3K comercial, GDC-0941, a una concentración de 10mg/kg o 75mg/kg. Después de las dos semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados y los tejidos fueron analizados. Se utilizaron de 4-6 machos obesos (8 meses con dieta rica en grasa) de menos de 1 año de edad.

## 2.4. Histología e inmunofluorescencia

Los tejidos, tras la necropsia, fueron fijados en 10%formalina durante 16 horas. Después fueron embebidos en parafina y cortados para su posterior tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E).

Para la morfometría del tejido adiposo blanco, se utilizó el programa ImageJ para medir el área de los adipocitos. Para realizar el histograma de la distribución de áreas, se midió el área en más de 500 adipocitos por ratón.

Para la detección de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH), previamente se congeló el músculo gastrocnemio en isopentano y se hicieron cortes de 10  $\mu$ m de grosor. Se incuban los cortes en la solución SDH (5 ml 0,25 ml 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 19 ml 0.2

M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 ml 0.2 M succinato sódico, 1 ml 10% (w/v) de tetrazolio nitroazul (NBT), ajustada a pH to 7.35 con 1 M NaOH) durante 1h a 37°C y posteriormente se fija con formalina. Después se montaron con un medio de montaje acuoso.

Para la detección de focos  $\gamma\text{H2AX}$  y 53BP1 por inmunofluorescencia en hígado, después de someter a los cortes de dicho tejido al proceso de exposición antigénica, se permeabilizaron las muestras mediante el tratamiento con una solución de tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon con una solución de albúmina de suero bovina (BSA) al 5% en PBS durante 1h a 37°C. A continuación se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos  $\gamma\text{H2AX}$  o 53BP1 (NB100-304, *Novus Biologicals*, dilución 1:500) y se lavaron 3 veces con PBS. Después se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc*, dilución 1:400) marcado con Cy3. Después de 5 lavados con PBS, se dejaron secar y se montaron con medio de montaje Vectashield con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) a 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (*Vector Laboratories*). La captura de las imágenes se realizó en el microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS-UV.

### 3. Experimentos *in vitro*

Las líneas celulares utilizadas fueron cultivadas con DMEM, (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco*), 10% de suero bovino fetal (FBS, *Foetal Bovine Serum; Sigma* o *Gibco*) y 1% de antibiótico antimicótico (*Gibco*). En todos los casos, las células se mantuvieron en incubadores a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 3.1. Preparación de fibroblastos murinos embrionarios (MEFs)

Este protocolo se llevó a cabo como describieron Palmero y Serrano en 2001 (Palmero and Serrano, 2001). Brevemente, se pusieron cruces pertinentes y se esperó hasta día E13.5 de desarrollo embrionario. En ese día se extraen los embriones del útero materno y se ponen en una placa de cultivo con PBS 1x y 1% antibiótico antimicótico. Uno a uno, se corta la cabeza (que se utilizará para extraer ADN y genotipar por PCR) y se separan las vísceras. El embrión se hace trocitos en una placa con 2x tripsina (*Gibco*) y se incuba a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 20 minutos. Pasado este tiempo se disgrega el embrión utilizando una pipeta Pasteur y se incuba de nuevo 20 minutos. Tras ese

tiempo, se plaquean en botellas de cultivo T75. Al día siguiente se cambia el medio. Llegados a confluencia (1-2 días) se transfieren las células a botellas de cultivo T150 y se espera 1-2 días hasta llegar a confluencia. En este momento las células se congelan en nitrógeno líquido.

### 3.2. Transducción retroviral

Para la transformación oncogénica de fibroblastos primarios se utilizó primero pLXSN-neo-E6 para immortalizar los fibroblastos y tras 10 días de selección con neomicina, los fibroblastos se infectaron con pWZL-blast-middle-T (cedido amablemente por Jean Zhao, Dana Farber Cancer Institute, Boston) o con pBABE-puro-EGFR<sup>L858R</sup> (adquirido en Addgene #11022, y depositado por William Sellers y Matthew Meyerson).

Para la reprogramación de fibroblastos embrionarios a células de tejido adiposo marrón, primero se immortalizaron los fibroblastos con pLXSN-neo-E6 y tras 10 días de selección con neomicina, se infectaron los fibroblastos con pBABE-puro-Prdm16 (adquirido en ADDGENE y depositado por Bruce Spiegelman) y con pBabe-puro-C/ebp $\beta$  (cedido amablemente por Roger R. Gomis; IRB, Barcelona).

Las pre-adipocitos 3T3L1 fueron transfectados con pBabe-puro-C/ebp $\beta$  (cedido amablemente por Roger R. Gomis; IRB, Barcelona).

Para la preparación de los retrovirus se utilizaron células empaquetadoras 293T que fueron transfectadas con 4  $\mu$ g de los plásmidos de interés y con 4  $\mu$ g de pLPC-Eco para la formación de los virus, utilizando Eugene 6 (*Roche*). A día 1 se plaquean  $8 \times 10^5$  células (fibroblastos o 3T3L1). A día 2 se recogen los sobrenadantes de las células 293T, se filtran con filtros de 45 $\mu$ m para evitar la contaminación con células empaquetadoras y se añade polibreno (8  $\mu$ g/ml) ya que facilita la agregación de las partículas virales y su unión a las membranas celulares. Estos sobrenadantes se diluyen 1:2 en medio fresco y se añaden a las células de interés. Este procedimiento se repite por la tarde y al día siguiente (día 3). 24 horas después, las células infectadas fueron seleccionadas en presencia de 1,5  $\mu$ g/ml de puomicina (*Sigma*), 200  $\mu$ g/ml de neomicina (*Gibco*) o 2  $\mu$ g/ml de blasticidina (*Calbiochem*). Una vez terminada la selección, las células se plaquearán para sus ensayos oportunos.

### 3.3. Ensayo de formación de colonias

Para este ensayo, se plaquearon  $2 \times 10^4$  fibroblastos embrionarios primarios en 3 placas de 10 cm de diámetro (p100) y se incubaron durante 3 semanas a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ , con cambios regulares de medio 2 veces a la semana. Pasado este tiempo, las células se fijaron con 2 ml de formaldehído (37%) por placa de 10 cm de diámetro, durante un mínimo de 30 minutos. A continuación se eliminó el medio con el fijador y se tiñeron las células con una solución de 20% Giemsa (*Sigma*) en PBS, durante 1 hora. Después se lavaron las placas con abundante agua, se dejaron secar y se contaron las colonias.

### 3.4. Ensayo de formación de focos

Para este ensayo, se infectaron fibroblastos primarios con el plásmido pLXSN-neo-E6 para inmortalizarlos y posteriormente se infectaron con pWZL-blast-middle-T o con pBABE-puro-EGFR<sup>L858R</sup>. Una vez seleccionadas con la droga de adecuada, se plaquearon  $1 \times 10^4$  en 3 placas de 10 cm de diámetro (p100) y se incubaron durante 2 semanas a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ , con cambios regulares de medio 2 veces a la semana. Pasado este tiempo, las células se fijaron con 2 ml de formaldehído (37%) por placa de 10 cm de diámetro, durante un mínimo de 30 minutos. A continuación se eliminó el medio con el fijador y se tiñeron las células con una solución de 20% Giemsa (*Sigma*) en PBS, durante 1 hora. Después se lavaron las placas con abundante agua, se dejaron secar y se contaron los focos.

### 3.5. Ensayo de proliferación 3T3

Este protocolo se llevó a cabo como describieron Todaro y Green en 1963 (Todaro and Green, 1963). Se plaquean  $10^6$  células de cada genotipo en placa de 10 cm de diámetro (p100). A los tres días se contó el número total de células y se volvieron a plaquear  $10^6$  células. El incremento en el número de divisiones de la población ( $\Delta\text{PDL}$ : *Population Doubling Level*) fue calculado según la fórmula  $\Delta\text{PDL} = \text{Log}(n_f/n_0)/\text{log}2$ , donde  $n_f$  es el número final de células y  $n_0$  el número inicial de células.

### 3.6. Estudio de la señalización de la ruta de insulina

Para este ensayo se plaquearon 150000 células en placas de seis pocillos. A las 24h, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio sin suero durante 24h, pasado este tiempo se incubaron 1h con PBS 1x. Posteriormente se añadió 1µg/ml de insulina (*Sigma*) durante 30 minutos. Tras este tiempo, se recogieron las células para su posterior análisis.

### 3.7. Diferenciación de adipocitos

Para la diferenciación de la línea de pre-adipocitos 3T3L1 en adipocitos marrones se siguió el protocolo descrito por Karamandilis G. en 2007 (Karamanlidis et al., 2007). Básicamente, primero se infectaron las células 3T3L1 con la construcción retroviral pBabe-puro-C/ebpβ y una vez seleccionadas con 1,5 µg/ml puromicina, se plaquearon 150000 células para su posterior diferenciación. Para la diferenciación, las células se cultivan hasta confluencia y se tratan dos días con el medio siguiente: DMEM con 10% FBS y 1% antibiótico antimicótico; 20 nM de insulina, 1 nM T3 (*Sigma*) , 1 µM de rosiglitazona (*Cayman Chemical*), 0,5 mM de isobutimetilxantina (*Sigma*), 125 nM de indometacina (*Sigma*) y 5 µM de dexametasona (*Sigma*). Pasados estos dos días, se cambia el medio y se añade el medio de mantenimiento que contiene DMEM, 10% FBS, 1% antibiótico antimicótico, 20 nM de insulina y 1 nM T3. Se cambia el medio cada dos días hasta la completa diferenciación de los adipocitos (6-8 días).

Las líneas de pre-adipocitos marrones procedentes de neonatos fueron cedidas por la Dra. Ángela Martínez Valverde (IIB, Madrid). Para su diferenciación en adipocitos marrones se plaquearon 150000 células en placas de 6 pocillos en medio de cultivo DMEM, 10% FBS, 1% antibiótico antimicótico, 20 nM de insulina y 1 nM de T3. Tras esperar a confluencia, se trataron 2 días con medio de diferenciación (DMEM, 10% FBS, 1% antibiótico antimicótico, 20 nM insulina, 1 nM T3, 0,5 µM Dexametasona, 0,125 µM indometacina; 0,5 mM isobutilmetilxantina y 1 µM rosiglitazona). Pasados esos dos días se cambió el medio por medio de mantenimiento (DMEM, 10% FBS, 1% antibiótico antimicótico, 20 nM insulina y 1 nM T3), que se cambia cada dos días hasta que los adipocitos estén totalmente diferenciados. Para comprobar la diferenciación, las placas se fijan formaldehído 10% durante mínimo 30 minutos y se tiñen con Oil-Red-O (*Sigma*). El Oil-Red se utiliza diluido en agua (por cada 3 ml de solución stock de Oil-

Red-O se diluye en 2 ml de agua). La solución stock tiene una concentración al 0,5% de Oil-red-O en isopropanol. Una vez diluido en agua, se filtra para evitar el precipitado y se añade 1 ml de la solución a las placas previamente fijadas.

### 3.8. Experimentos in vitro con los inhibidores de PI3K

Las células 3T3L1-C/Ebp $\beta$ , los pre-adipocitos marrones o los adipocitos marrones una vez diferenciados se lavaron con PBS y se trataron durante 4 horas con medio DMEM 10% FBS que contenía 10, 1 o 0,1  $\mu$ M de forskolina (*Sigma*) (según se indique) y/o con 10 ó 1  $\mu$ M de compuesto A (según se indique). Se utilizaron pre-adipocitos marrones para los ensayos con los inhibidores de PI3K: Compuesto A (10, 1 y 0,1  $\mu$ M), GDC-0941 (10, 1 y 0,1  $\mu$ M) y LY-294002 (200, 20 y 2  $\mu$ M); se plaquearon  $2 \times 10^5$  células y se trataron durante 4h. Posteriormente las células se recogieron para la extracción de proteína o RNA.

### 3.9. Generación de tejido adiposo marrón ectópico

La reprogramación de fibroblastos primarios y su transplante para la generación de tejido adiposo marrón se hizo como describieron S. Kajimura y B. Spiegelman en 2009 (Kajimura et al., 2009). Los fibroblastos murinos embrionarios fueron inmortalizados con pLXSN-neo-E6 y posteriormente transducidos retroviralmente con pBabe-puro Prdm16 y C/ebp $\beta$ . Después de la selección con el correspondiente antibiótico, se expandieron los cultivos celulares y se inyectaron por vía subcutánea ( $10 \times 10^6$  células por sitio de inyección) a ratones inmunodeficientes (se usaron machos de 10 semanas de edad). Después de dos meses los ratones fueron sacrificados y los depósitos de tejido adiposo marrón ectópico fueron procesados para histología. En algunos casos este tejido adiposo marrón ectópico no se llegó a formar. Las áreas ocupadas por este tejido adiposo marrón ectópico se cuantificaron excluyéndose las áreas que contenían tejido adiposo blanco y granulomas derivados de la inyección subcutánea.

## 4. Ensayos bioquímicos

### 4.1. Extracción de ADN

Para el genotipaje de los ratones y de los fibroblastos embrionarios se aisló ADN procedente de la cola o la cabeza, respectivamente. Tras incubar el tejido durante la



noche con proteinasa K, (0,4 µg/ml; Roche) se añaden 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifuga durante 5 minutos. Se separa la fase acuosa a la que se le añade 500 µl de isopropanol para precipitar el ADN, posteriormente se lava con Etanol 70%, se deja secar el precipitado y se resuspende en agua destilada. Se hace la dilución oportuna y se realiza una PCR en condiciones estándar para conocer el genotipo. Los oligonucleótidos que se utilizaron para el genotipaje se encuentran en la **Tabla 3**.

## 4.2. Extracción de ARN y análisis de ADNc por RT-PCR

Para el aislamiento de ARN se tratan las células o se homogeneizan los tejidos con Trizol (Invitrogen) y posteriormente se añade 0,2 volúmenes de cloroformo, se agita y se incuba 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12000g 15 minutos a 4°C. Se recoge la fase acuosa y se le añade 1 volumen de isopropanol. Se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 12000g 15 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se lava con 500 µl de etanol 70%. Después se deja secar el precipitado y se resuspende en agua destilada-0,1%DEPC.

Para la retrotranscripción de ARN en ADNc se usó el kit *Ready-To-Go™ you-Prime First-Strand Beads* (GE Healthcare) y cebadores aleatorios (*random primers*, Invitrogen).

La cuantificación de ADNc se realizó PCR cuantitativa a tiempo real (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) utilizando DNA Master Sybr Green mix 2x. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la **Tabla 4**. Para la normalización de la expresión de ARN se utilizó β-actina.

## 4.3. Extracción de proteínas e inmunodetección

Los extractos de proteínas se obtuvieron lisando las células o los tejidos con el tampón de lisis RIPA que contiene 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.2, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolato y 5 mM EDTA suplementado con inhibidores de proteasas (2 mg/ml de aprotinina, 2 mg/ml de leupeptina, 2 mg/ml de pepstatina y PMSF 1 mM) e inhibidores de fosfatasa (ortovanadato sódico 0.1 mM y NaF 0.1 mM). Después de 20 minutos en hielo, los extractos celulares se sonicaron durante 5 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm a 4°C. La cuantificación de la cantidad



de proteína se midió por el método de Bradford (*Sigma*). De 20-30 µg de proteína fueron cargados en geles de gradiente de Nupage Bis-Tris 4%-20% (*Invitrogen*) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Whatman Protran®*). Las membranas se bloquearon durante la noche con 5% leche en TBS-Tween 0,2%. Los anticuerpos se incubaron con 5% BSA en TBS-Tween 0,2%. Los anticuerpos procedentes de Cell Signaling fueron utilizados para detectar Pten (#9552), P-S473-Akt (#4058), P-T308-Akt (#9275), P-T24/T32-Foxo1/3 (#9464), P-S636/S639 Irs1 (#2388), P-S240/S244-S6 (#2215), y S6 (#2217). Para la detección de Akt se utilizó un anticuerpo de Upstate (#07-416) y para β-actina se utilizó uno de Sigma (AC-15). Todos los anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:500, excepto β-actina que se utilizó a 1:10000.

La detección de proteína se realizó por quimioluminiscencia usando ECL (*GE Healthcare*) y posterior autorradiografía con películas *Amersham Hyperfilm™ ECL* (*GE Healthcare*).

## 5. Análisis estadísticos

Las curvas de supervivencia se compararon utilizando el test logrank. En otros análisis estadísticos que se indican en el apartado de “Resultados” se utilizó el test de Fisher o el test de Student de dos colas. La regresión de COX y el análisis de la covarianza (ANCOVA) de modelos lineales generales (GLMs) se desarrollaron utilizando la aplicación informática R. (<http://www.r-project.org>)

## 6. Tablas de oligonucleótidos utilizadas

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para genotipaje de ratones y fibroblastos embrionarios murinos

| NOMBRE           | SECUENCIA                                 |
|------------------|---|
| O16-T7 Rv        | 5' TCA TCT CGG CTC CAT CGT TT 3'          |
| T7 Fw            | 5' CCG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG 3'     |
| SP6 Fw           | 5' GTC GAC ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG 3' |
| O16-SP6 Rv_      | 5' AGACTCTTTCCATCCTACATGGTGAC 3'          |
| PTEN exón1 Fw    | 5' TGC GAG GAT TAT CCG TCT TCT C 3'       |
| PTEN exón1 Rv    | 5' TGC ACA ACC CAA AGC GTC TA 3'          |
| PTEN exón 1 Fw 2 | 5' CCA GTC TCT GCA ACC ATC CAG 3'         |
| PTEN exón 1 Rv 2 | 5' TAT GCA CAA CCC AAA GCG TCT 3'         |
| PTEN exón 3 Fw   | 5' GAG CTG GGT ACA CTT GAA CTG CTA ATA 3' |
| PTEN exón 3 Rv   | 5' TCT GTC TCC TTA GAA GCC ATC GT 3'      |
| PTEN exón 5 Fw   | 5' GGG TGA CGT GCA TTT GGA TT 3'          |
| PTEN exón 5 Rv   | 5' TCC AGG TAG GTC TTG GAT GTT CTC 3'     |

| NOMBRE                            | SECUENCIA                                |
|-----------------------------------|--|
| PTEN exón 7 Fw                    | 5' GTA AAG TTG CCT CTA TGC AGT TCA CA 3' |
| PTEN exón 7 Rv                    | 5' AGC CAA CAA ACT AAG GGT CGG 3'        |
| PTEN exón 9 Fw                    | 5' GCA CAG TAG TCA ATC TTC AGG TCA TC 3' |
| PTEN exón 9 Rv                    | 5' CAC ATC AGC CTG TCT CCA CTT T 3'      |
| PtenR 24B9 (Pten <sup>+/-</sup> ) | 5' CCATCATTCACAGCCACTCTA 3'              |
| PGKr 2B2 (Pten <sup>+/-</sup> )   | 5' GCCTACCCGCTTCCATTGCT 3'               |
| PGen1 (Pten <sup>+/-</sup> )      | 5' TGGGAAGAACCTAGCTTGGAGG 3'             |
| pTARBAC Fw                        | 5' ACCGACGATACAAGTGGAAACAGT 3'           |
| pTARBAC Rv                        | 5' TCGCCCAACAAGTGCTTATG 3'               |
| p53f_12B7 (p53 <sup>-/-</sup> )   | 5' TGG TTT GTG CGT CTT AGA GAC AGT 3'    |
| p53r_1B3 (p53 <sup>-/-</sup> )    | 5' AAG GAT AGG TCG GCG GTT CAT 3'        |
| pPNTf_2B5 (p53 <sup>-/-</sup> )   | 5' CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA 3'        |

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

| NOMBRE         | SECUENCIA                           |
|----------------|-------------------------------------|
| β-Actina Fw    | 5' GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG 3'   |
| β-Actina Rv    | 5' GTG GTG GTG AAG CTG TAG CC 3'    |
| Adiponectin Fw | 5' GGA TGC TAC TGT TGC AAG CTC 3'   |
| Adiponectin Rv | 5' TCC TGT CAT TCC AAC ATC TCC 3'   |
| Adipor1 Fw     | 5' GCA TCT CTG CCA TCA TTG TG 3'    |
| Adipor1 Rv     | 5' TGG ACA CAC CAT AGA AGT GGA C 3' |
| Adipor2 Fw     | 5' GAG CCC AGC TTA GAG ACA CCT 3'   |
| Adipor2 Rv     | 5' TAG CAC ATC GTG AGG GAT CA 3'    |
| aP2 Fw         | 5' GCA GAC GAC AGG AAG GTG A 3'     |
| aP2 Rv         | 5' CTT GTG GAA GTC ACG CCT TT 3'    |
| Cidea Fw       | 5' ATC ACA ACT GGC CTG GTT ACG 3'   |
| Cidea Rv       | 5' TAC TAC CCG GTG TCC ATT TCT 3'   |
| Cox7a1 Fw      | 5' CAG CGT CAT GGT CAG TCT GT 3'    |
| Cox7a1 Rv      | 5' AGA AAA CCG TGT GGC AGA GA 3'    |
| Cox8b Fw       | 5' GAA CCA TGA AGC CAA CGA CT 3'    |
| Cox8b Rv       | 5' GCG AAG TTC ACA GTG GTT CC 3'    |
| CoxIVb Fw      | 5' AGA TGA ACC ATC GCT CCA AC 3'    |
| CoxIVb Rv      | 5' ATG GGG TTG CTC TTC ATG TC 3'    |
| Cpt1a Fw       | 5' TCA ATC GGA CCC TAG ACA CC 3'    |
| Cpt1a Rv       | 5' CTT TCG ACC CGA GAA GAC CT 3'    |
| Cpt1-m-Fw      | 5' CAA GTC ATG GTG GGC AAC TA 3'    |
| Cpt1-m-Rv      | 5' GCT GCT TGC ACA TTT GTG TT 3'    |
| Cyt C Fw       | 5' GGA GGC AAG CAT AAG ACT GG 3'    |
| Cyt C Rv       | 5' TCC ATC AGG GTA TCC TCT CC 3'    |
| Elovl3 Fw      | 5' GAT GGT TCT GGG CAC CAT CTT 3'   |
| Elovl3 Rv      | 5' CGT TGT TGT GTG GCA TCC TT 3'    |
| Glut1 Fw       | 5' GCA GTT CGG CTA TAA CAC TGG 3'   |
| Glut1 Rv       | 5' AGG CCA ACA GGT TCA TCA TC 3'    |
| Glut4 Fw       | 5' ACG GTC TTC ACG TTG GTC TC 3'    |
| Glut4 Rv       | 5' CTC AAA GAA GGC CAC AAA GC 3'    |
| Lcad Fw        | 5' TTG GAT TCT CAA TGG AAG CA 3'    |
| Lcad Rv        | 5' GGC AAT CGG ACA TCT TCA AA 3'    |
| Mcad Fw        | 5' GGA GCA GCC AAT GAT GTG T 3'     |
| Mcad Rv        | 5' GGT TAG AAC GTG CCA ACA AGA 3'   |

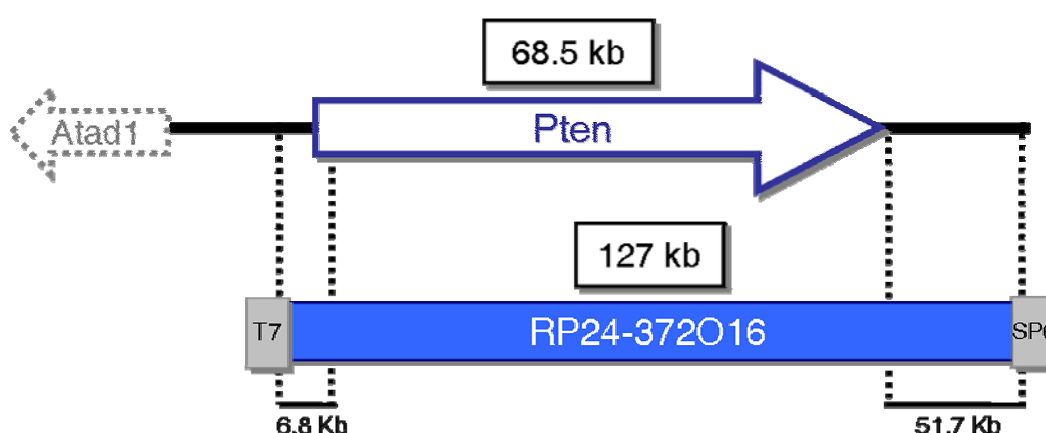
| NOMBRE                 | SECUENCIA                                   |
|------------------------|---|
| mouse p16 Fw           | 5' TAC CCC GAT TCA GGT GAT 3'               |
| mouse p16 Rv           | 5' TTG AGC AGA AGA GCT GCT ACG T 3'         |
| MyH2 Fw (MyHC IIa)     | 5' GCA AAC ACG AGA GAC GAG TG 3'            |
| MyH2 Rv (MyHC IIa)     | 5' CAG CTT GTT GAC CTG GGA CT 3'            |
| MyH4 Fw (MyHC IIb)     | 5' AAC CTG ATG CAG GCT GAG AT 3'            |
| MyH4 Rv (MyHC IIb)     | 5' TCC TGC TCC TTC TTC AGC TC 3'            |
| Pdk4 Fw                | 5' CGC TTA GTG AAC ACT CCT TCG 3'           |
| Pdk4 Rv                | 5' CGA ACT TTG ACC AGC GTG T 3'             |
| Pgc1a Fw               | 5' AAG TGT GGA ACT CTC TGG AAC TG 3'        |
| Pgc1a Rv               | 5' GGG TTA TCT TGG TTG GCT TTA TG 3'        |
| Ppard Fw               | 5' ACC AGA ACA CAC GCT TCC TT 3'            |
| Ppard Rv               | 5' TTG CGG TTC TTC TTC TGG AT 3'            |
| Pparg Fw               | 5' AGG CCG AGA AGG AGA AGC TGT TG 3'        |
| Pparg Rv               | 5' TGG CCA CCT CTT TGC TCT GCT C 3'         |
| Pten Fw                | 5' CAA ATA TTA TTG CTA TGG GAT TTC CTG C 3' |
| Pten Rv                | 5' GCT GTG GTG GGT TAT GGT CTT C 3'         |
| Tnni1 Fw (TropoI slow) | 5' GCC TCC ACA ACA CCA GAG AG 3'            |
| Tnni1 Rv (TropoI slow) | 5' GCC AGA CAT AGC CTC CAC AT 3'            |
| Ucp1 Fw                | 5' ACT GCC ACA CCT CCA GTC ATT 3'           |
| Ucp1 Rv                | 5' CTT TGC CTC ACT CAG GAT TGG 3'           |
| Ucp3 Fw                | 5' ACT CCA GCG TCG CCA TCA GGA TTC T 3'     |
| Ucp3 Rv                | 5' TAA ACA GGT GAG ACT CCA GCA ACT T 3'     |

## **RESULTADOS**



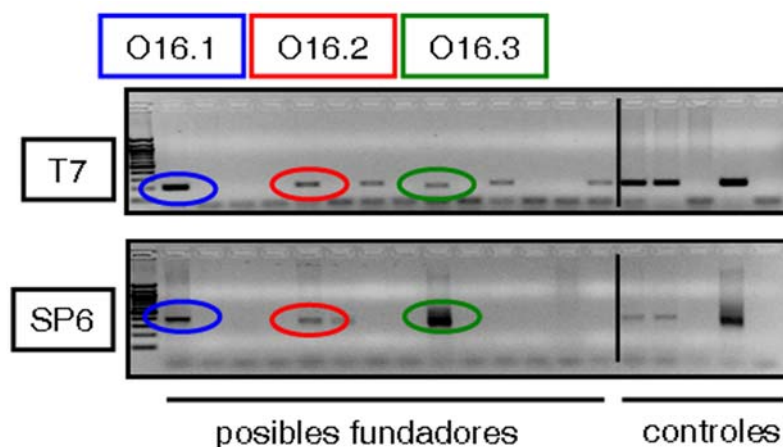
## 1. Generación del ratón transgénico Pten

Para entender el posible papel de PTEN sobre el metabolismo y el envejecimiento generamos los ratones Pten<sup>tg</sup>. Para ello, se utilizó un cromosoma artificial de bacterias (BAC) que contiene toda la secuencia genómica de Pten incluyendo las regiones reguladoras. El BAC elegido fue un fragmento de DNA de 127 kb clonado en el vector pTARBAC que contiene las secuencias T7 y SP6 flanqueando al fragmento de DNA (Figura 8). Estas secuencias T7 y SP6, se usarán posteriormente para la estrategia de genotipaje de los ratones que lleven integrado el BAC en su genoma.



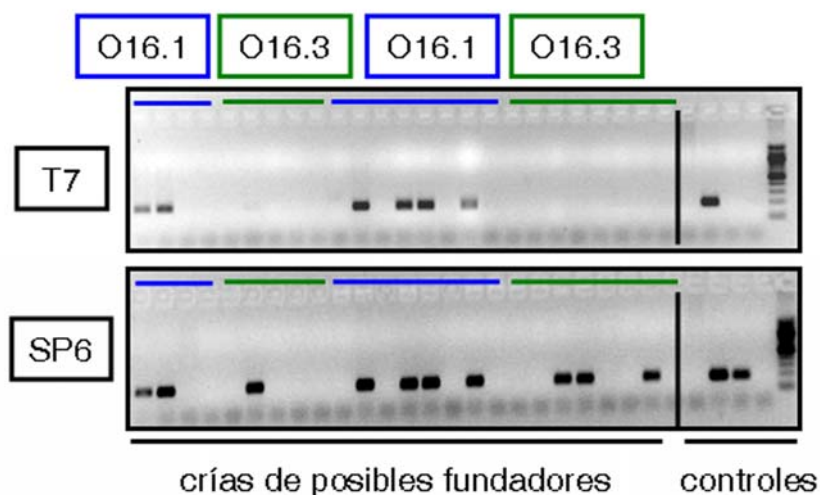
**Figura 8.** Esquema de la secuencia genómica de Pten y BAC utilizado para la microinyección. El BAC elegido no contiene ninguna secuencia completa de otro gen.

Después de linearizar el BAC con la encima de restricción PI-SceI, el BAC se microinyectó en oocitos fecundados de fondo mixto F1[CBA/BL6] que se implantaron en hembras pseudo-gestantes. Se obtuvieron 14 ratones y se comprobó que llevaban el transgén por PCR del extremo T7 y SP6. De los 14 ratones analizados, se encontraron tres posibles fundadores ya que resultaban positivos para las PCRs de T7 y SP6 (O16.1, O16.2 y O16.3) (Figura 9).



**Figura 9. Estrategia de genotipado de los posibles fundadores.** PCR de las regiones terminales SP6 y T7 del BAC en los ratones nacidos de la microinyección. Se obtuvieron 3 posibles fundadores, llamados O16.1, O16.2 y O16.3.

El siguiente paso fue analizar si estos fundadores transmitían el transgén. Para ello se cruzaron con ratones *wild type* de fondo C57BL6 y se analizó la progenie por PCR de las regiones terminales T7 y SP6. Como se puede observar en la **Figura 10**, el posible fundador O16.1 transmite el transgén completo ya que la PCR es positiva para ambas regiones, T7 y SP6; mientras que en la descendencia del ratón O16.3, sólo está presente el extremo SP6. Los resultados del genotipaje de las crías de O16.2 no se muestran, pero fueron negativos para ambas regiones terminales. En resumen, una línea de las tres generadas transmitía el transgén completo y a los descendientes del fundador O16.1 los llamamos ratones Pten<sup>tg</sup>.



**Figura 10. El ratón fundador O16.1 transmite el transgén.** Genotipaje de la descendencia de los posibles fundadores O16.1 y O16.3. La progenie que descende del fundador O16.1 tiene el BAC completo. La línea que descende del fundador O16.3 sólo lleva el extremo SP6 del BAC.

## 2. Caracterización del ratón transgénico Pten

Se analizaron las camadas descendientes del fundador O16.1 y sucesivas y se observó que son viables y también fértiles. De 571 ratones nacidos, 409 fueron *wild type* (72%) y 162 fueron Pten<sup>tg</sup> (28%), por lo que las esperadas proporciones mendelianas (50% *wild type*; 50% Pten<sup>tg</sup>) de transmisión del BAC no se cumplen (**Tabla 5**). También se analizaron embriones de 13.5 días. De 77 embriones analizados, 42 eran *wild-type* (55%) y 35 (45%) eran Pten<sup>tg</sup> que si cumplen las proporciones mendelianas indicando que la reducción en el número de transgénicos no es un problema en el desarrollo embrionario al menos hasta este día (**Tabla 5**), y sugiere que la reducción en el número de ratones transgénicos viables se debe a una muerte perinatal. Una posible explicación es la muerte por abandono de la madre debido a las que las crías Pten<sup>tg</sup> son más pequeñas (como se verá más adelante). Hay en la literatura otros casos de modelos genéticamente modificados, como los animales deficientes en el receptor de la hormona del crecimiento, GHR-null, que nacen más pequeños y mueren debido al abandono de las madres (Coschigano et al., 2003).

|                         | Cruces Pten <sup>+/+</sup> x Pten <sup>+/+tg/+</sup> |          |                    |          |
|-------------------------|--|----------|--------------------|----------|
|                         | embriones de 13.5 días                               |          | ratones destetados |          |
|                         | observado  | esperado | observado          | esperado |
| Pten <sup>+/+</sup>     | 55% (42)   | 50%      | 72% (409)          | 50%      |
| Pten <sup>+/+tg/+</sup> | 45% (35)   | 50%      | 28%(162)           | 50%      |
| Test de Fisher          | p=0,1  |          | p=0,00001          |          |

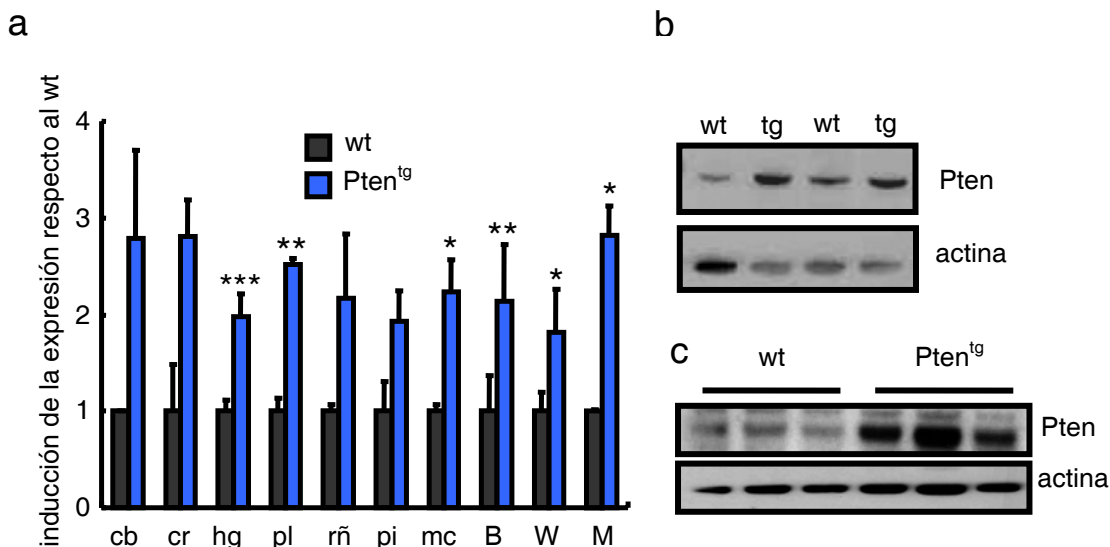
**Tabla 5. Letalidad perinatal de los ratones Pten<sup>tg</sup>**

### 2.1. Expresión del alelo transgénico de Pten

El siguiente paso en la caracterización de esta línea fue el análisis de la expresión de Pten en distintos tejidos y en fibroblastos embrionarios (MEFs). Para ello se utilizaron tres ratones machos de cada genotipo. Se analizó la expresión de ARN mensajero (ARNm) de Pten en cerebro, pulmón, corazón, hígado, músculo, timo, piel, tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo marrón (BAT) y fibroblastos embrionarios (MEFs) mediante qRT-PCR. Como podemos observar en la **Figura 11a**, la expresión de PTEN en los distintos tejidos de los ratones Pten<sup>tg</sup> es mayor que en los *wild type*, siendo la media dos veces mayor con respecto al *wild type*. Además se midieron los niveles de



proteína de Pten mediante Western Blot (WB) en cerebro (**Figura 11b**) y en MEFs (**Figura 11c**) lo que confirma que también hay más proteína.



**Figura 11. Los ratones Pten<sup>tg</sup> tienen más expresión de Pten.** a. Niveles de ARNm en los tejidos indicados (cb: cerebro; cr: corazón; hg: hígado; pl: pulmón; rñ: riñón; pi: piel; mc: músculo; B: BAT, tejido adiposo marrón; W: WAT, tejido adiposo blanco; M: MEFs, fibroblastos murinos embrionarios). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . b. Inmunodetección de Pten en cerebro. c. Inmunodetección de Pten en MEFs.

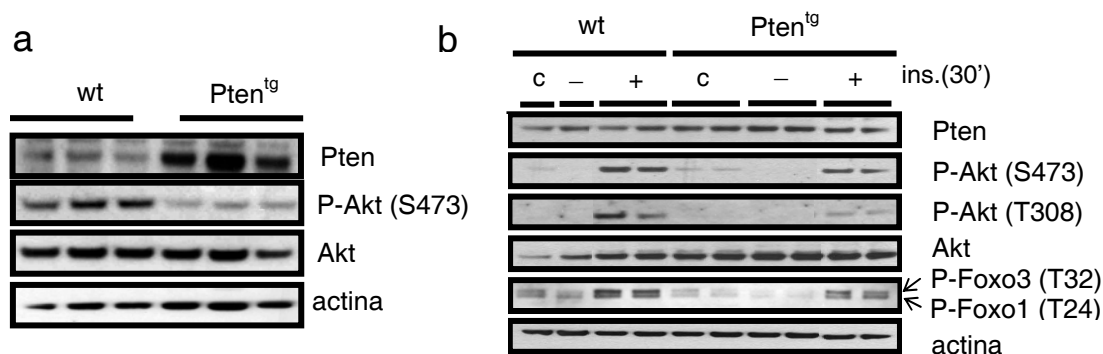
## 2.2. Funcionalidad del transgén

Una vez generados los ratones Pten<sup>tg</sup>, nos preguntamos si este transgén era funcional tanto *in vivo* como *in vitro*.

### 2.2.1. Funcionalidad del transgén *in vitro*. Estudios en MEFs

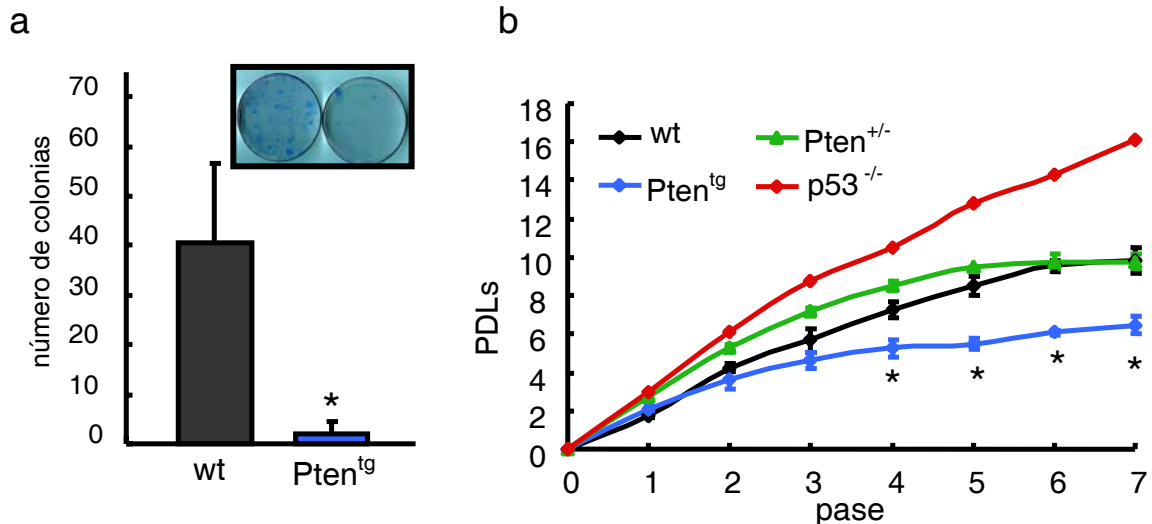
Para estudiar el impacto de la sobre-expresión de Pten en la ruta de señalización de PI3K *in vitro* utilizamos fibroblastos murinos embrionarios (MEFs) y miramos si la presencia del alelo transgénico de Pten afectaba a la fosforilación de Akt en el residuo Serina 473 (S473), principal diana de la activación de la ruta de señalización de PI3K. Como se puede ver en la **Figura 12a**, acompañando a unos mayores niveles de proteína de Pten, se ve una menor fosforilación en el residuo S473 de Akt. También se estudió la ruta de señalización de PI3K después de estimular las células con insulina, uno de los principales activadores de dicha ruta (Summers and Birnbaum, 1997). Como se observa en la **Figura 12b**, después de estimular con insulina, hay una menor fosforilación de Akt tanto en el residuo S473 (fosforilación mediada por mTORC2 (Hresko and

Mueckler, 2005; Jacinto et al., 2006; Sarbassov et al., 2005)) como en el residuo treonina 308 (T308) mediada por la quinasa PDK1 (Alessi et al., 1997), necesarias para la activación de Akt. Además se observa una menor fosforilación en la treonina 24 (T24) de Foxo1 y en la treonina 32 (T32) de Foxo3a, proteínas que son dianas de la actividad quinasa de Akt y cuya fosforilación mediada por Akt inhibe la función de estos dos factores de transcripción.



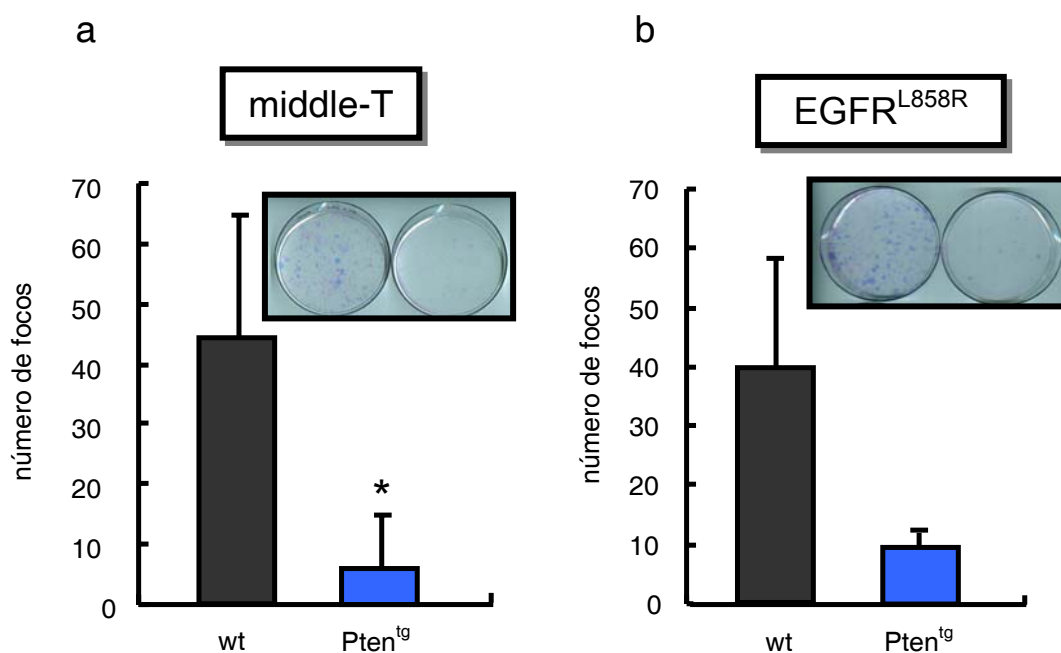
**Figura 12. Reducción de la señalización de la ruta PI3K/AKT en los MEFs Pten<sup>tg</sup>** a. Niveles de proteína de Pten, P-Akt (S473) y Akt en MEFs primarios. b. Detección de los niveles de proteína de Pten, P-Akt (S473), P-Akt (T308), Akt y P-Foxo1/3a (T24/T32) en condiciones estándar de cultivo (C), sin suero 24h (-), sin suero 24h y estimuladas con 1μg/ml de insulina durante 30 minutos (+).

Para estudiar el potencial proliferativo de los MEFs se hizo un ensayo de formación de colonias en el que se plaquearon los MEFs a baja densidad (20000 células por placa de 10 cm de diámetro). Se vio que los MEFs Pten<sup>tg</sup> tienen una capacidad menor de formar colonias que los MEFs *wild type* (**Figura 13a**) y además se observó en el protocolo 3T3 ("3-day transfer inoculum of  $3 \times 10^5$  cells") que las células Pten<sup>tg</sup> tienen una tasa de proliferación menor y entran antes en senescencia (**Figura 13b**) con lo que podemos concluir que tienen una capacidad proliferativa menor.



**Figura 13. Los fibroblastos embrionarios Pten<sup>tg</sup> tienen una capacidad proliferativa menor. a.** Ensayo de formación de colonias. Las gráficas muestran el número de colonias formadas después de 3 semanas en cultivo. n=3 alícuotas independientes de MEFs por genotipo. **b.** Cultivo seriado 3T3 de MEFs Pten<sup>tg</sup>. Las gráficas representan el número de divisiones celulares (PDL) que cada cultivo acumula en cada pase. Como control se incluyen curvas de crecimiento correspondientes a MEFs *wild type* y p53<sup>-/-</sup>. La significancia estadística entre el wt y Pten<sup>tg</sup> fue calculada con la prueba t de Student. \*p<0,05.

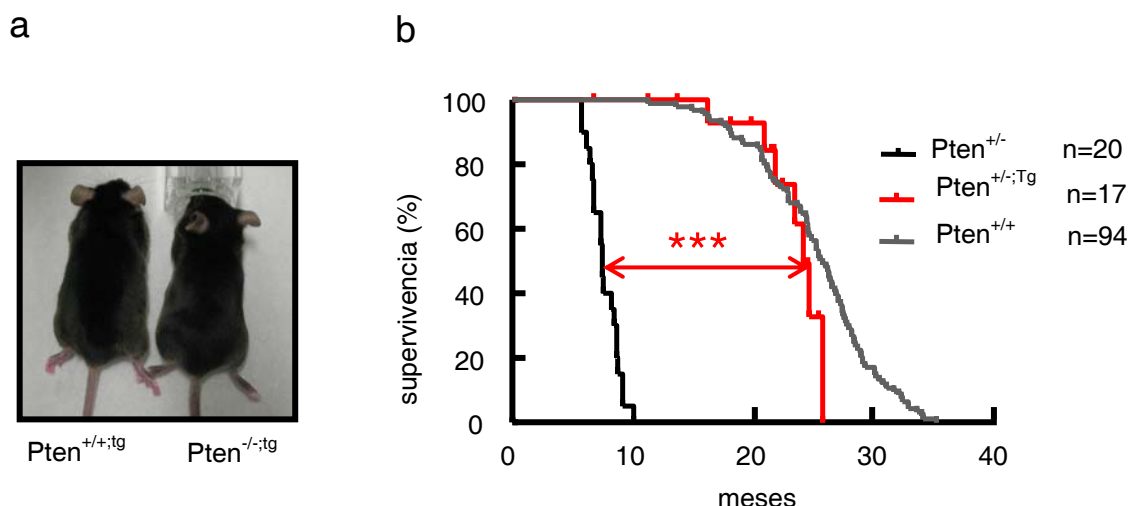
Posteriormente estudiamos la susceptibilidad de los MEFs Pten<sup>tg</sup> a la transformación oncogénica mediada por los oncogenes middle-T y EGFR<sup>L858R</sup>. La actividad oncogénica de estos genes es dependiente de la función de PI3K (Druker et al., 1990; Sordella et al., 2004; Utermark et al., 2007; Zhao et al., 2006). Para este experimento se usaron MEFs previamente inmortalizados con la oncoproteína E6 (procedente del papilomavirus humano) la cual se une a p53 y promueve su degradación (Munger et al., 1992). En ambos casos, después de infectar los MEFs, previamente inmortalizados, con middle-T y EGFR<sup>L858R</sup> y plaquear a baja densidad (10000 células en placa de 10 cm de diámetro) se observó que los MEFs Pten<sup>tg</sup> son más resistentes a la transformación oncogénica que los MEFs *wild-type* (**Figura 14a y b**). Por tanto podemos decir que los MEFs Pten<sup>tg</sup> están protegidos de la transformación oncogénica mediada por middle-T y EGFR<sup>L858R</sup>.



**Figura 14.** Los MEFs Pten<sup>tg</sup> son más resistentes a la transformación oncogénica inducida por middle-T (a) y EGFR<sup>L858R</sup> (b). Ensayo de formación de focos en el que se muestran el número de focos formados por los MEFs inmortalizados con E6 e infectados con los oncogenes indicados (n=3 por genotipo) después de plaquear 10000 células en placas de 10 cm de diámetro y tras tres semanas en cultivo. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación típica. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \*p<0,05.

### 2.2.2. Funcionalidad del transgén in vivo

Para comprobar la funcionalidad del transgén in vivo, cruzamos los ratones Pten<sup>tg</sup> con ratones Pten heterocigotos (Pten<sup>+/-</sup>), intentando así rescatar el fenotipo letal embrionario de los ratones que no poseen Pten (Pten<sup>-/-</sup>) (Di Cristofano et al., 1998). Después de los cruces necesarios, se consiguió que nacieran ratones Pten<sup>-/-</sup>tg (**Figura 15a**) y además se consiguió retrasar la aparición de cáncer prematuro de los ratones Pten<sup>+/-</sup> como muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier en la **Figura 15b**.



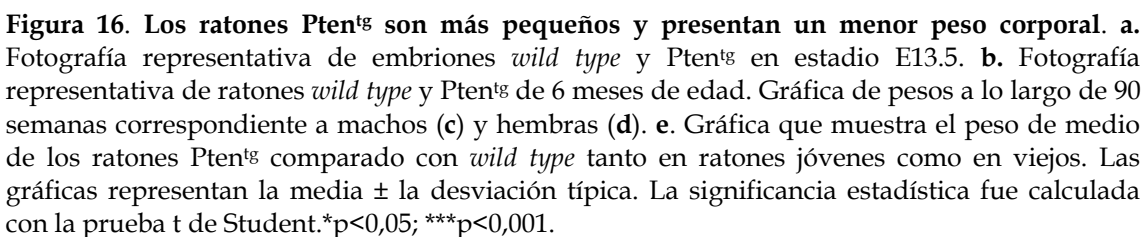
**Figura 15.** El transgén rescata el fenotipo de los ratones  $Pten^{-/-}$  y  $Pten^{+/-}$ . **a.** Fotografía representativa que muestra que el transgén es capaz de rescatar la letalidad embrionaria de los ratones  $Pten^{-/-}$ . **b.** Curva de supervivencia Kaplan-Meier donde se muestra que los ratones  $Pten^{+/-;tg}$  rescatan el fenotipo de cáncer prematuro de los ratones  $Pten^{+/-}$ . La significancia estadística de la curva de supervivencia se calculó por el test log-rank. \*\*\* $p < 0,001$

### 3. Estudio del efecto de Pten sobre metabolismo

Debido a que Pten es uno de los moduladores negativos de la ruta de señalización PI3K/AKT que participa activamente en el metabolismo de la glucosa quisimos abordar el fenotipo metabólico que pudieran tener los ratones que poseían sobreexpresión de Pten. Por ello, estudiamos distintas características metabólicas como el peso corporal, la ingesta de comida, el gasto energético, la respuesta a una dieta rica en grasas, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón.

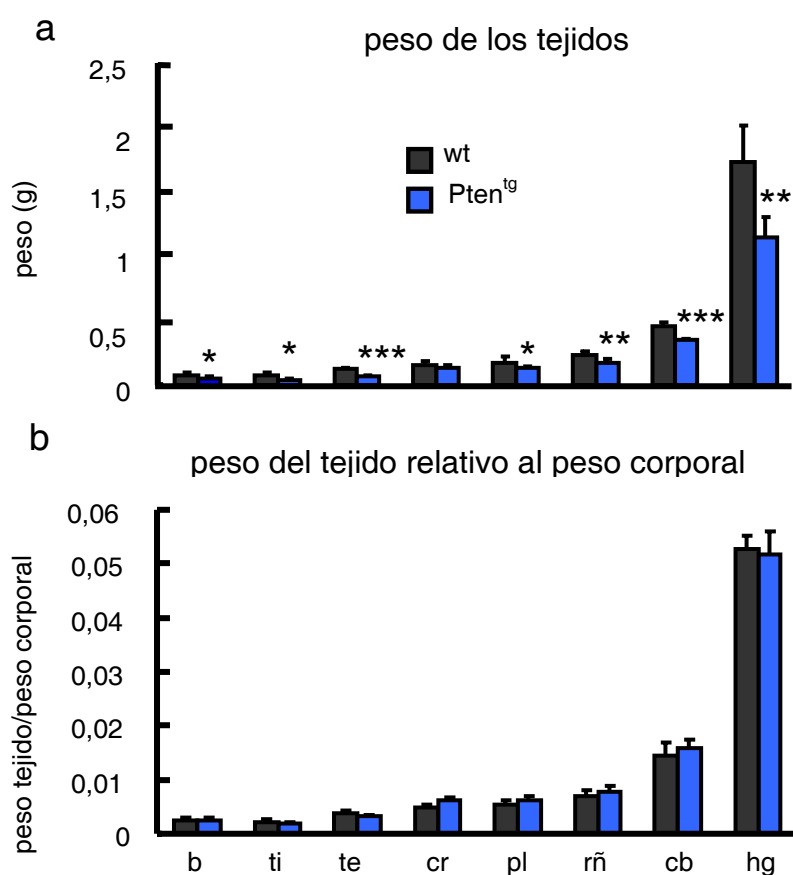
#### 3.1. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el peso corporal

El primer fenotipo que nos llamó la atención, fue que estos ratones son más pequeños como se puede observar en la **Figura 16** tanto en estadio embrionario E13.5 (**Figura 16a**) como en estadio adulto (**Figura 16b**). Seguimos su evolución de pesos durante casi dos años y se observó que tenían un peso corporal menor (**Figura 16c**). Los machos jóvenes  $Pten^{tg}$  pesan un 27% menos que los machos *wild-type* y las hembras un 28% menos, siendo más acusada esta diferencia conforme los ratones van envejeciendo llegando a un 35% de reducción de peso en los machos  $Pten^{tg}$  viejos y un 44% en las hembras  $Pten^{tg}$  viejas (**Figura 16d y e**).



Este fenotipo es similar a otros modelos de ratones que tienen la señalización de la ruta de PI3K disminuida como el modelo  $Ak1^{+/-};Akt2^{-/-};Akt3^{-/-}$  (Dummler et al., 2006) o el modelo de ratón  $S6K1^{-/-}$  (Um et al., 2004) donde ven una reducción en el tamaño corporal. También se ha publicado que los modelos de ratones con una señalización disminuida en el eje insulina/IGF1 también presentan un tamaño corporal reducido (Bartke, 2008).

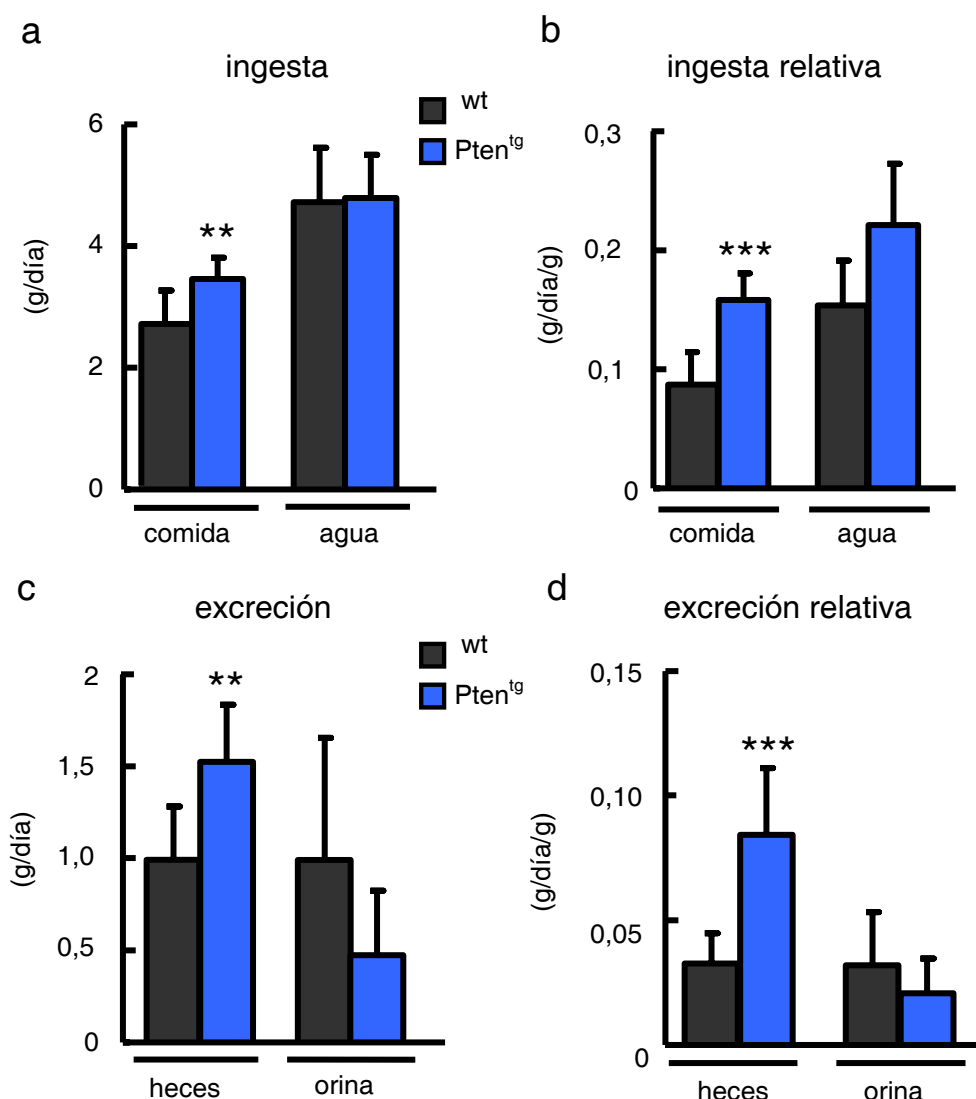
Además comprobamos que esta reducción en el tamaño corporal, era proporcional al tamaño de los órganos y que no presentaban defectos en el tamaño de los tejidos analizados (**Figura 17a y b**)



**Figura 17. Los órganos de los ratones  $Pten^{tg}$  tienen el mismo tamaño relativo que los órganos de los ratones *wild type*.** a. Peso de los órganos de los ratones  $Pten^{tg}$ . b. Peso de los tejidos indicados relativizado al peso corporal de los ratones (b: bazo; ti: timo; te: testículo; cr: corazón; pl: pulmón; rñ: riñón; cb: cerebro; hg: hígado). Las barras representan la media  $\pm$  la desviación típica. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $n=8$  machos por genotipo de 3 meses de edad.

### 3.2. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre la ingesta

Ante la reducción del tamaño corporal, nos planteamos si se debía a un problema de falta de nutrición así que medimos la ingesta y la excreción utilizando para ello cajas metabólicas. Vimos que los ratones transgénicos comen más (**Figura 18a y c**) y cuando se relativiza al peso corporal esta diferencia se hace mayor (**Figura 18b y d**). Estas diferencias sugieren que los ratones  $Pten^{tg}$  son hiperfágicos, lo cual, combinado con el hecho de que pesan menos, sugiere que podrían tener una alteración en el gasto energético.

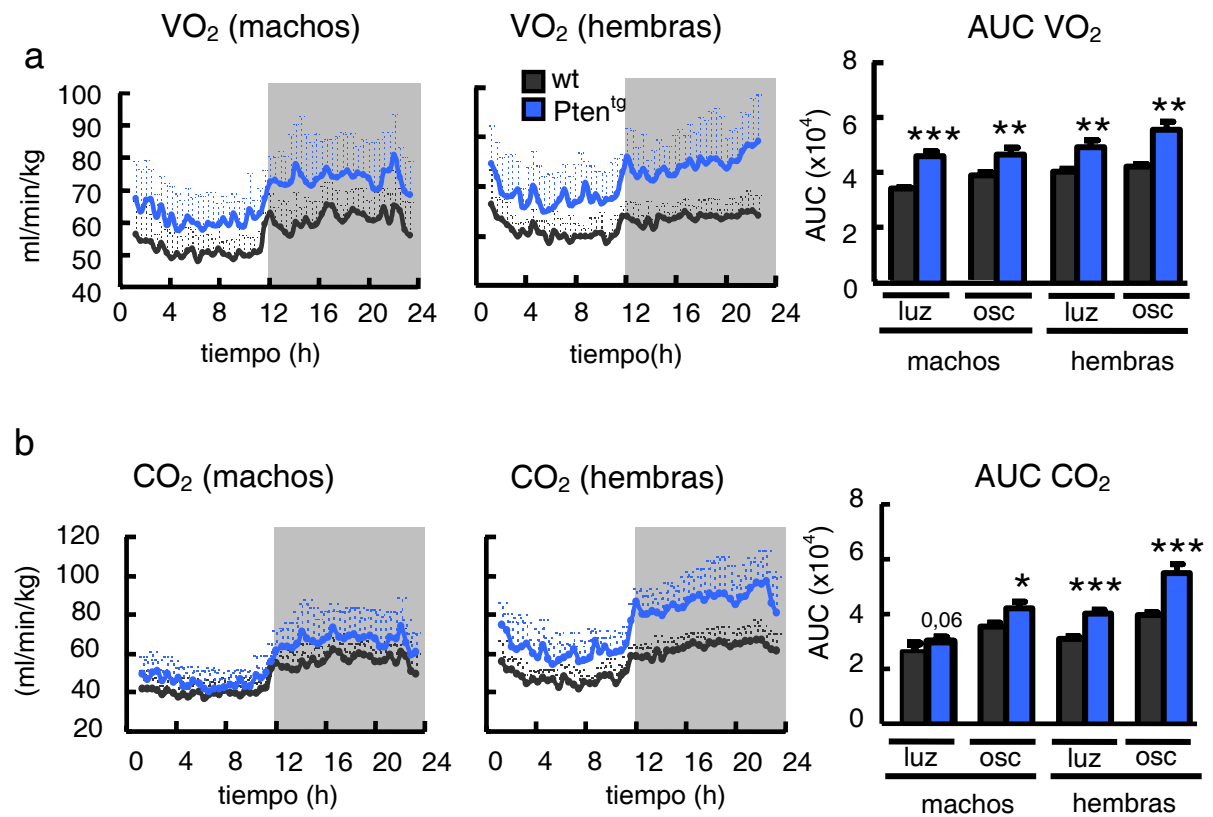


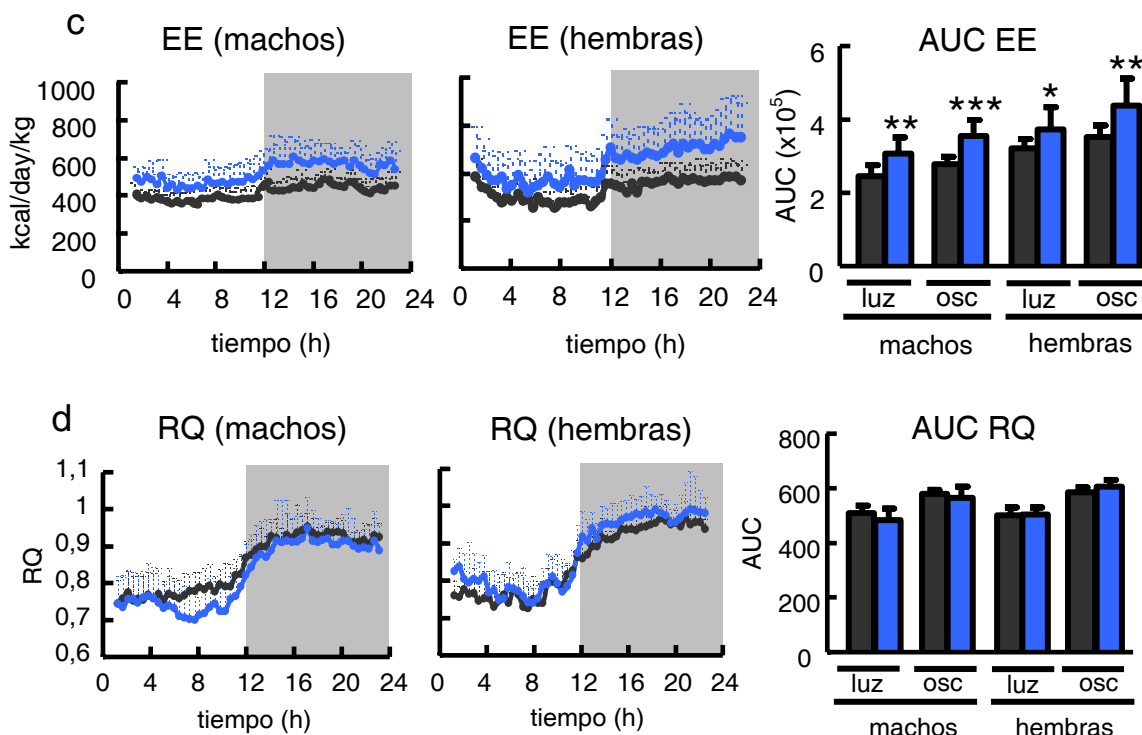
**Figura 18. Los ratones  $Pten^{tg}$  son hiperfágicos.** a. Medida de la ingesta de agua y comida de los ratones  $Pten^{tg}$ . b. Medida de la excreción (heces y orina) de los ratones  $Pten^{tg}$ . c. Medida de la ingesta relativa al peso del ratón de los ratones  $Pten^{tg}$ . d. Medida de la excreción relativa al peso de cada ratón. Se utilizaron 8 ratones por grupo y estuvieron 4 días en las cajas metabólicas. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación típica. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



### 3.3. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el gasto energético

Para medir el gasto energético (*energy expenditure*, EE) de los ratones, éstos se trasladaron a la unidad de fenotipado del Instituto de Ciencias de la Salud en Zaragoza (I+CS). Allí se realizaron estudios de calorimetría indirecta a 23°C con acceso a comida y agua, en el que se midió en un periodo de 24h el oxígeno consumido, el CO<sub>2</sub> exhalado y con estos valores se calculó el gasto energético. Se observó que los ratones Pten<sup>tg</sup> tienen un mayor consumo de VO<sub>2</sub>, una mayor producción de CO<sub>2</sub> y por lo tanto un mayor gasto energético (**Figura 19a, b y c**), lo que podría explicar que fueran hiperfágicos. Sin embargo no observamos cambios en el cociente respiratorio (RQ). (**Figura 19d**) que es un indicador del sustrato que se utiliza como fuente de energía (los valores oscilan entre 0,7 (grasas) y 1 (carbohidratos)).





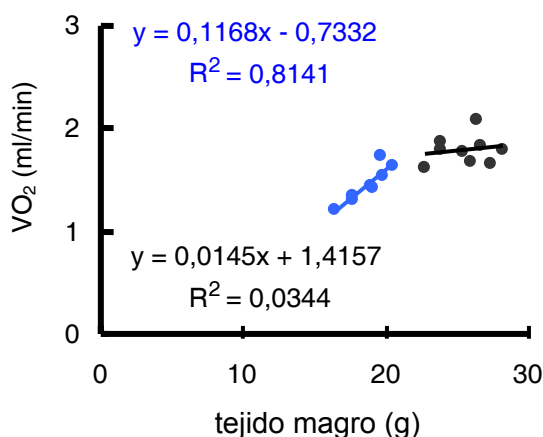
**Figura 19. Los ratones *Pten<sup>tg</sup>* tienen mayor gasto energético.** a. Consumo de O<sub>2</sub> de machos (izquierda) y hembras (centro) durante 24h (12 horas de periodo diurno, 12 horas de periodo nocturno) a 23°C. A la derecha se representa el área bajo la curva (AUC) de las gráficas de machos y hembras. b. Producción de CO<sub>2</sub> de machos (izquierda) y hembras (centro) durante 24h (12 horas de periodo diurno, 12 horas de periodo nocturno) a 23°C. A la derecha se representa el área bajo la curva (AUC). c. Gasto energético (EE) de machos (izquierda) y hembras (centro) durante 24h (12 horas de periodo diurno, 12 horas de periodo nocturno) a 23°C. A la derecha se representa el área bajo la curva (AUC). d. Cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) de machos (izquierda) y hembras (centro) durante 24h (12 horas de periodo diurno, 12 horas de periodo nocturno) a 23°C. A la derecha se representa el área bajo la curva (AUC). Se utilizaron 8-10 ratones por sexo y genotipo. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación típica. La significancia estadística del AUC fue calculada con la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

La medida del gasto energético en kcal/día/kg está siendo muy discutida (Arch et al., 2006; Nedergaard and Cannon, 2010) y no hay acuerdo sobre cómo corregir el gasto energético por el peso, especialmente cuando se trata de grupos de animales con distinto peso corporal y con distinta adiposidad (el tejido graso es casi inactivo metabólicamente). Algunas publicaciones indican que hay que representar el gasto energético como Kcal/día (sin corregir por el peso), otros como kcal/día/kg o kcal/día/kg<sup>0,75</sup> y otros en lugar de utilizar el peso total del animal se plantean usar como divisor el peso del tejido magro, tejido metabolitamente activo que no incluiría el peso de la grasa. Esto tampoco es una solución satisfactoria pues la división por el peso (total o magro) asume que ambos parámetros son directamente proporcionales, cuando experimentalmente se sabe que no es este el caso. La solución mas rigurosa plantea que

es necesaria la aplicación de modelos lineales generales (GLMs) y análisis de la covarianza (ANCOVA) para demostrar que este gasto energético es debido al genotipo y no a las diferencias de peso de cada grupo experimental (Arch et al., 2006).

Siguiendo estas indicaciones, aplicamos un modelo lineal general con las medidas de peso del tejido magro (considerado el tejido metabólicamente activo) frente a la tasa metabólica basal medida a 23°C y a 30°C. La tasa metabólica basal (RMR, *resting metabolic rate*) se define como la media de las 3 medidas de consumo de O<sub>2</sub> más bajas durante el periodo diurno (Feldmann et al., 2009). La tasa metabólica basal no se ve afectada por la actividad del animal ni por la energía usada en consumir y digerir alimentos. En el caso de la termoneutralidad (30°C), también se minimiza el gasto energético en termogénesis. Por estas razones, se consideran que estas medidas son más precisas.

En primer lugar, hicimos un gráfico en el que el eje de las X representa los valores de tejido magro (g) y en el eje de las Y los valores de RMR y ajustamos la nube de puntos de cada grupo a una recta (**Figura 20**).



**Figura 20. Regresión lineal de RMR a 23°C.** Gráfico donde se representa el tejido magro (g) frente al RMR a 23°C (media de las 3 medidas de VO<sub>2</sub> más bajas durante el día).

Se comprobó que los valores seguían una distribución normal utilizando el test Kolmogorov-Smirnov y se examinó la homogeneidad de las varianzas a lo largo de la recta de regresión de los genotipos utilizando el test F. Estas dos premisas deben cumplirse para poder aplicar un modelo lineal. El modelo lineal general (GLM) se usó para representar RMR como variable dependiente en función del genotipo (factor:

wt=0, tg=1) y del peso del tejido magro (LM) como covariable. El modelo lineal general indica que, en este caso, existe interacción significativa entre las variables (señalado en la ecuación del GLM como \*). Esto puede observarse gráficamente en la **Figura 20** ya que la interacción implica que las pendientes de las dos rectas de regresión son muy diferentes. Estas son las ecuaciones del modelo lineal:

$$\text{RMR}_{23^{\circ}\text{C}} = 1,41568 - 2,149(\text{Genotipo}(0,1)) + 0,01450 (\text{LM}) + 0,10231(\text{Genotipo}(0,1)*\text{LM});$$

$$R^2: 0,7701.$$

Las cuales se pueden reescribir como:

$$\text{RMR}_{23^{\circ}\text{C}-\text{wild type}} = 1,41568 + 0,01450 (\text{LM}); R^2: 0,034.$$

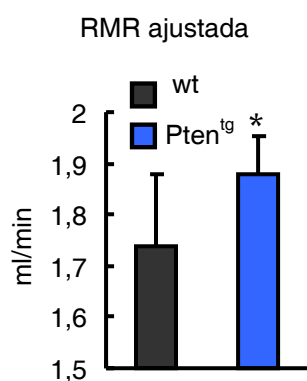
$$\text{RMR}_{23^{\circ}\text{C}-\text{tg}} = (1,41568 - 2,149) + (0,01450 + 0,1) (\text{LM}); R^2: 0,81.$$

Por tanto no se puede aplicar por definición un modelo lineal general, ni se puede hacer un análisis de la varianza (ANCOVA) ya que las rectas deberían tener pendientes parecidas. Así, seguimos las recomendaciones que se habían publicado anteriormente (Arch et al., 2006) en las que se sugiere el uso de una recta de regresión para cada grupo para predecir qué RMR correspondería a cada animal de cada grupo si hubiera tenido un tejido magro correspondiente a la media de tejido magro del *wild type* y de *Pten<sup>tg</sup>* combinado.

$$\text{RMR}_{\text{adj\_wild type}} = \text{RMR}_{\text{observada\_wild type}} - (\text{LM}_{\text{pendiente\_wild type}}(\text{LM}_{\text{observada\_wild type}} - \text{LM}_{\text{media\_wild type+tg}}))$$

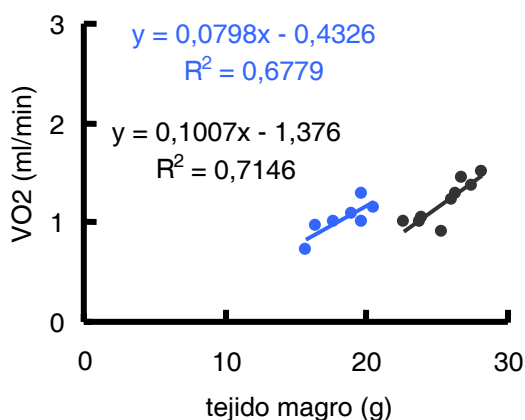
$$\text{RMR}_{\text{adj\_tg}} = \text{RMR}_{\text{observada\_tg}} - (\text{LM}_{\text{pendiente\_tg}}(\text{LM}_{\text{observada\_tg}} - \text{LM}_{\text{media\_wild type+tg}}))$$

Estas ecuaciones se utilizaron para calcular los valores de RMR ajustados y se representaron en un diagrama de barras (**Figura 21**) calculando su significancia estadística aplicando un test de Student el cual salió significativo.



**Figura 21. RMR ajustada a 23°C.** Los ratones *Pten<sup>tg</sup>* tienen mayor RMR a 23°C. Gráfico donde se representa la RMR ajustada. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación típica. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ .

El modelo lineal general también se aplicó cuando se estudió el gasto energético a 30°C, es decir, a termoneutralidad. El estado de termoneutralidad se considera a la temperatura en la cual no se estimula la producción de calor para mantener la temperatura corporal. En ratones, esta temperatura es 30°C. Además en este estudio a 30°C los ratones están en ayunas por lo que el gasto de energía que se registrará será el debido a mantener su metabolismo basal y no se empleará en actividad física para buscar comida y alimentarse. En estas condiciones se midió la tasa metabólica basal y representó frente al tejido magro en un gráfico XY (valores en la **Tabla 6** y **Figura 22**).



**Figura 22. Regresión lineal de RMR a 30°C** Gráfico donde se representa el tejido magro (g) frente al RMR (media de las 3 medidas de VO<sub>2</sub> más bajas durante el día) a 30°C.

Se comprobó que los valores seguían una distribución normal utilizando el test Kolmogorov-Smirnov y se examinó la homogeneidad de las varianzas a lo largo de la recta de regresión de los genotipos utilizando el test F. Se aplicó el modelo lineal general al igual que en el estudio a 23°C y se vio que este modelo no tenía interacción. Esta es la ecuación:

$$\text{RMR}_{30^{\circ}\text{C}} = -1.14789 + 0.49410 (\text{Genotipo } (0,1) + 0.09181 (\text{LM})$$

R<sup>2</sup>: 0.746.

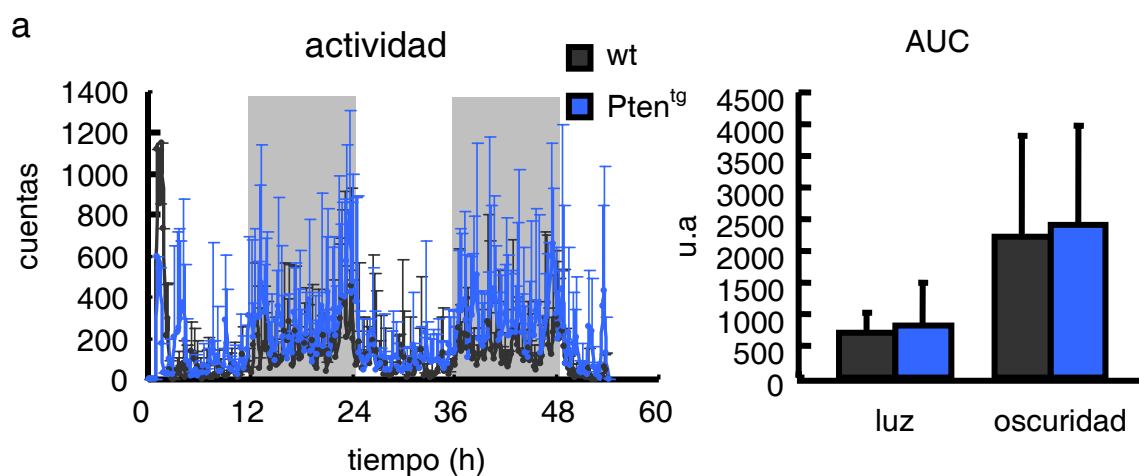
Al no tener interacción se hizo un análisis de la covarianza (ANCOVA) y se observó que la tasa metabólica basal sí se ve afectada significativamente por el genotipo además de por peso del tejido magro (ver **Tabla 6**)

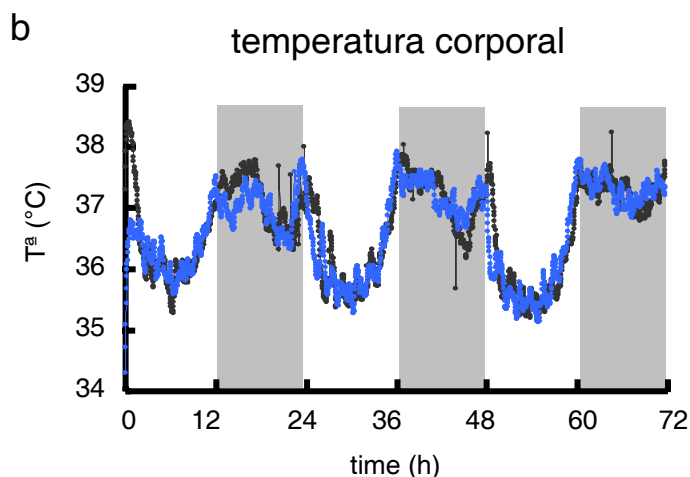
|                     | Genotipo*LM<br>interacción | ANCOVA<br>genotipo | ANCOVA<br>LM | RMR ajustada a<br>la recta de<br>regresión |
|---------------------|----------------------------|--------------------|--------------|--|
| RMR <sub>23°C</sub> | 0,03                       | n.a                | n.a          | 0,025                                      |
| RMR <sub>30°C</sub> | 0,56                       | 3,0e-03            | 2,5e-04      | n.a  |

**Tabla 6. Resumen de los test estadísticos utilizados durante el análisis del gasto energético.** El modelo lineal general para RMR<sub>23°C</sub> predice que hay interacción entre la variable genotipo y la variable tejido magro (LM). Para RMR<sub>30°C</sub> no hay interacción (segunda columna). En la tercera y cuarta columna se muestra el p-valor del análisis de la covarianza de genotipo y tejido magro (LM) con respecto a RMR. A 23°C no es aplicable (n.a.). En la quinta columna se muestra la significancia estadística del test t de Student para la RMR a 23°C.

Todos estos análisis estadísticos nos llevan a la conclusión de que los ratones *Pten<sup>tg</sup>* tienen mayor gasto energético que los ratones control.

Dos parámetros que influyen en el gasto energético son la actividad locomotora y la temperatura corporal. Se midieron ambos parámetros durante 48h-72h y se observó que ambos grupos tienen la misma actividad locomotora (**Figura 23a**) y temperatura corporal (**Figura 23b**). Así pues se pueden excluir estos factores como posibles explicaciones de un mayor gasto energético.

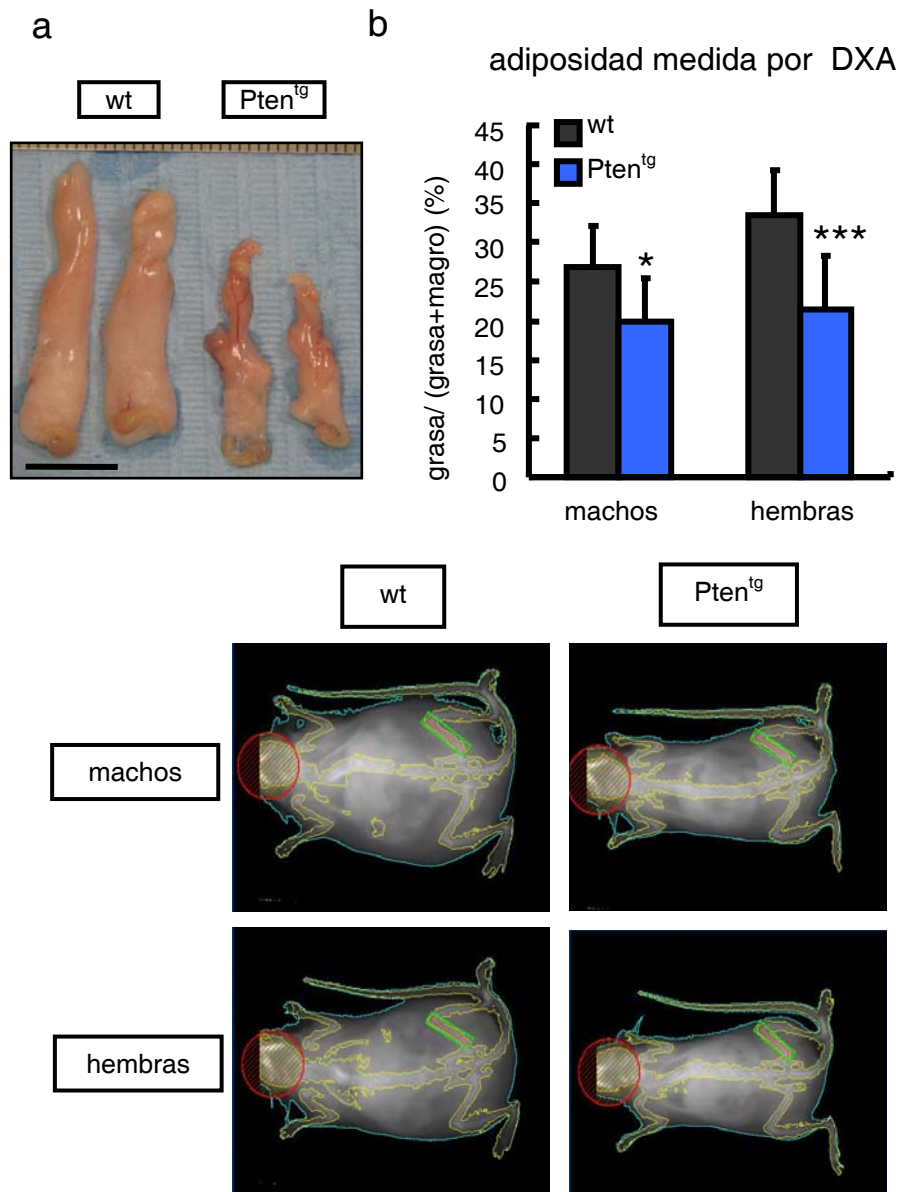




**Figura 23. Los ratones PTEN tg tienen la misma actividad locomotora y la misma temperatura corporal que los ratones wt. a.** Actividad locomotora medida utilizando cajas de actividad durante 48 horas (dos periodos diurnos y dos nocturnos). El gráfico de barras de la derecha representa el área bajo la curva (AUC) en el periodo de luz y oscuridad. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar.  $n=8$  machos por genotipo de 3 meses de edad. **b.** Temperatura corporal medida por transmisor implantado en la región peritoneal de los ratones. Por telemetría, se graban datos de temperatura cada 2 minutos durante 72h a 23°C. Los valores corresponden a la media.  $n=6$  por genotipo de 6 meses de edad.

### 3.4. Impacto de la sobre-expresión de Pten en el tejido adiposo blanco

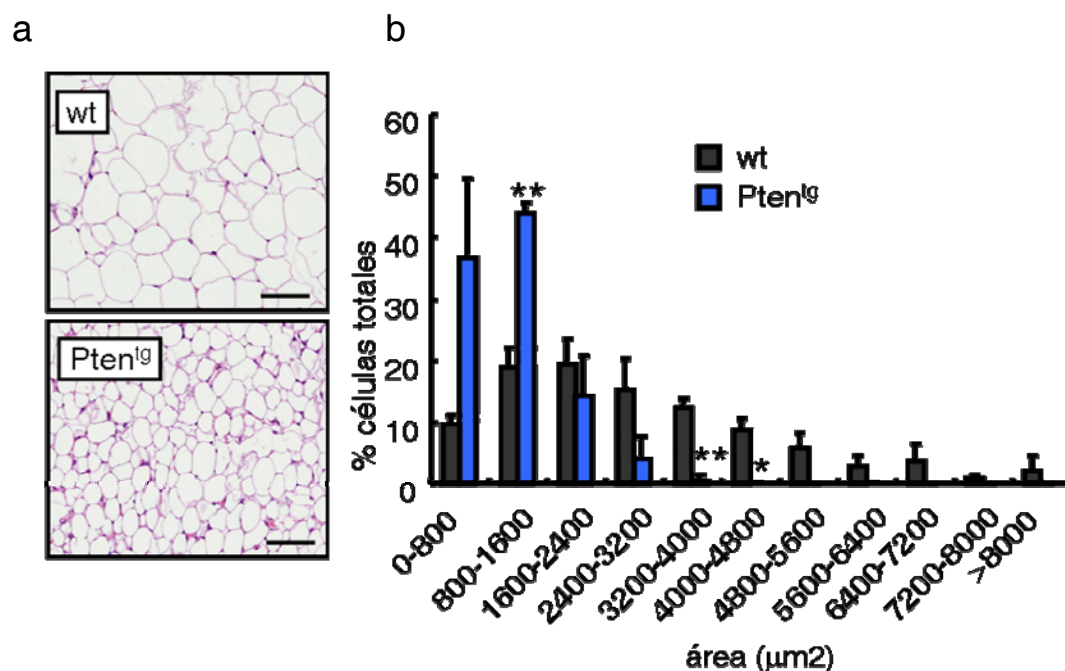
Los altos niveles de gasto energético están asociados generalmente a una reducción en el almacenamiento de nutrientes y a la protección frente al daño metabólico. En un primer estudio de la grasa del ratón *Pten<sup>tg</sup>*, nos dimos cuenta que presentaba una menor acumulación de grasa (**Figura 24a**). Para profundizar en el estudio de la grasa, medimos la cantidad acumulada en los ratones transgénicos y en los *wild-type* utilizando la técnica de densitometría (DXA, *Dual energy X ray Absorptiometry*) tanto en machos como hembras y se observó que tienen una menor cantidad de grasa (**Figura 24b**).



**Figura 24. Menor adiposidad en los ratones Pten<sup>tg</sup>.** **a.** Imagen representativa de la grasa epididimal de ratones *wild type* (izquierda) y ratones Pten<sup>tg</sup> (derecha). **b.** Adiposidad medida por DXA en la que se representa el cociente entre la cantidad de grasa en gramos dividido por la cantidad de grasa más la cantidad de tejido magro. En la parte inferior de la figura, aparecen imágenes representativas de los resultados del DXA. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

En un análisis de la distribución de superficie celular de los adipocitos blancos (morfometría) se observó que en los ratones Pten<sup>tg</sup>, el área de los adipocitos es menor que en los ratones wt (**Figura 25**). Por lo que podemos concluir que los ratones Pten<sup>tg</sup> son más delgados porque acumulan menos grasa que los ratones *wild type*.

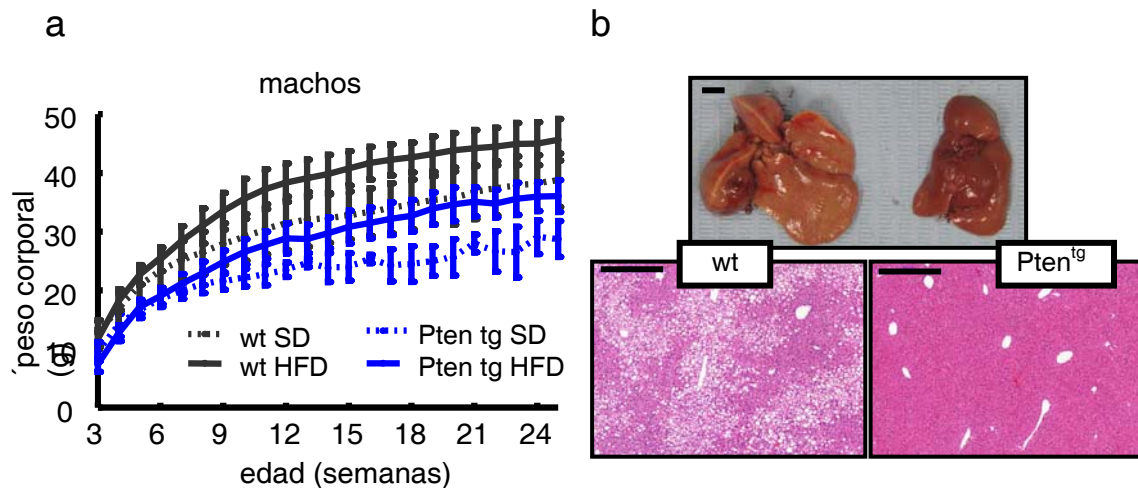




**Figura 25. Reducción del tamaño de los adipocitos en los ratones *Pten<sup>tg</sup>*.** a. Corte histológico y tinción con H&E de la grasa epididimal de ratones wild type (arriba) y ratones *Pten<sup>tg</sup>* (debajo). Las barras indican 100µm. b. Histograma de la distribución de las áreas de los adipocitos en ratones *Pten<sup>tg</sup>*. Las barras representan el porcentaje de los adipocitos totales que tienen el área indicada. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

### 3.5. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el daño metabólico producido por HFD

Es conocido que la alimentación continuada con HFD provoca una acumulación de grasa en el hígado que termina derivando en el desarrollo de hígado graso o esteatosis, lo que puede provocar esteatohepatitis no alcohólica (Perlemuter et al., 2007). Dado que los altos niveles de gasto energético están asociados generalmente a una reducción en el almacenamiento de nutrientes y a la protección frente al daño metabólico, quisimos explorar el impacto de la sobre-expresión de Pten frente al daño metabólico producido por HFD. Tras 6 meses de alimentación con una dieta rica en grasa, los ratones *Pten<sup>tg</sup>* engordaron igual que los *wild type* (Figura 26a). Sin embargo, estos ratones estaban protegidos frente a la esteatosis derivada de la alimentación rica en grasas (Figura 26b).



**Figura 26. Los ratones Pten<sup>tg</sup> están protegidos frente al daño metabólico derivado del HFD.** a. Curvas de peso de ratones wt y Pten<sup>tg</sup> en SD (línea punteada) y HFD (línea continua). b. Imágenes representativas de hígados tras 6 meses en HFD (la barra indica 1cm). Debajo, tinción con H&E de los hígados (las barras indican 500μm).

Estos resultados nos indican que una moderada sobre-expresión del supresor de tumores Pten resulta en un aumento del gasto energético, menor acumulación de grasa y una mejor protección contra el daño metabólico.

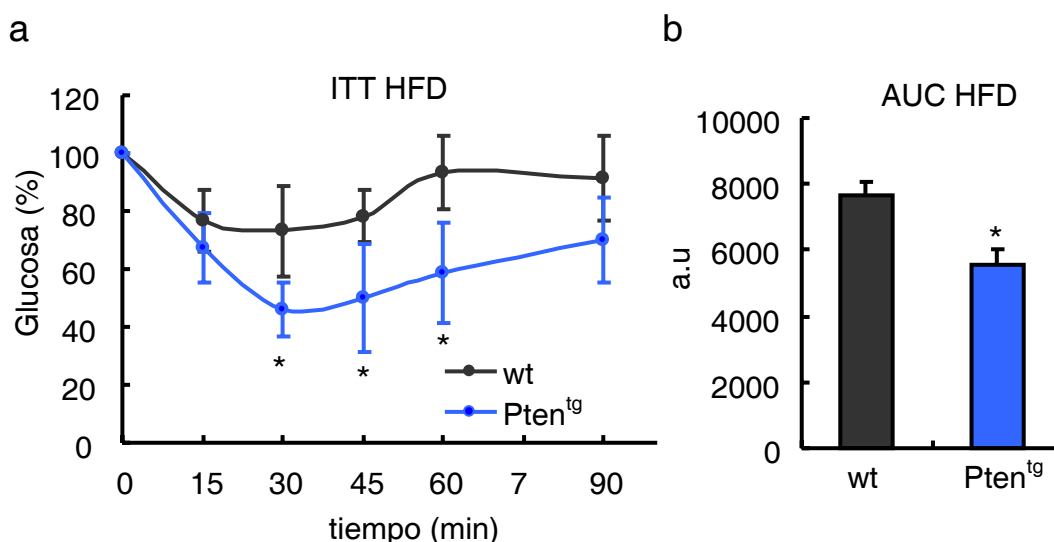
### 3.6. Impacto de la sobre-expresión de Pten sobre el metabolismo de la glucosa

En respuesta a factores de crecimiento, la señalización mediada por PI3K/AKT regula la captación de nutrientes en las células. Una de las funciones más importantes de Akt es estimular la captación de glucosa en respuesta a la insulina (Lizcano and Alessi, 2002). La activación de Akt permite al receptor de glucosa Glut4 translocarse a la membrana y facilitar la entrada de glucosa al interior celular (Kohn et al., 1996). Por su implicación como regulador negativo de la ruta de señalización de PI3K/AKT, Pten podría tener un papel importante sobre el metabolismo de la glucosa. Se ha publicado anteriormente que la delección específica de Pten en hígado (Stiles et al., 2004), músculo (Wijesekara et al., 2005) y grasa (Kurlawalla-Martinez et al., 2005) aumenta la sensibilidad a la insulina. Además se ha visto que los ratones que poseen solo una copia del gen Pten (Pten<sup>+/-</sup>) presentan mejor tolerancia a la glucosa y ven aumentada su sensibilidad a la insulina (Wong et al., 2007).

En concordancia, en nuestros experimentos *in vitro* con fibroblastos embrionarios, hemos visto que la señalización de la insulina está disminuida en las células Pten<sup>tg</sup>.

Con estos antecedentes, quisimos explorar en detalle cómo estaba afectado el metabolismo de la glucosa en los ratones Pten<sup>tg</sup> *in vivo*.

Para ello realizamos un test de tolerancia a la glucosa (GTT) tras un ayuno de 16h. Los ratones Pten<sup>tg</sup> presentaron similar tolerancia a la glucosa que los ratones wt, aunque hubiera cabido esperar que fueran más intolerantes. Así mismo, hicimos el test de tolerancia a la insulina (ITT) y si bien observamos una tendencia a una mayor sensibilidad, estas diferencias no fueron significativas en los ratones Pten<sup>tg</sup> jóvenes. Sin embargo tras la exposición crónica de 6 meses a la dieta rica en grasa (HFD), los ratones Pten<sup>tg</sup> tienen una mejor sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones wt (**Figura 27**).



**Figura 27. Los ratones Pten<sup>tg</sup> son más sensibles a la insulina tras la exposición crónica a HFD.** **a.** Test de tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones wt y Pten<sup>tg</sup> tras 6 meses de tratamiento con dieta rica en grasa (HFD). **b.** Área bajo la curva (AUC) del test de tolerancia a la insulina. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ .  $n = 4$  por genotipo

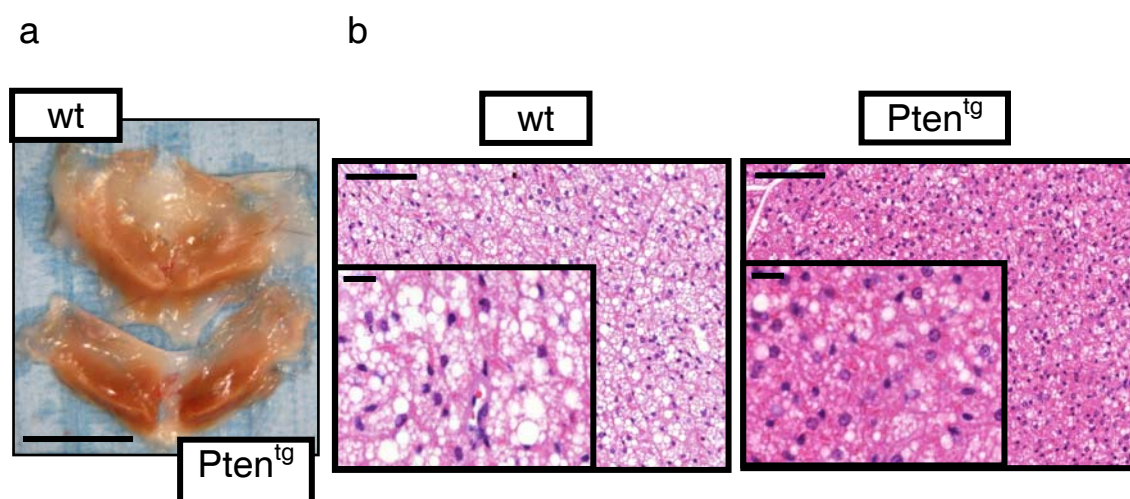
Tras una continua exposición a la señalización de la insulina como en el caso de una ingesta de dieta rica en grasa, la ruta de señalización de ésta se desensibiliza y los ratones se hacen intolerantes a la glucosa y resistentes a la insulina. En el caso de los ratones Pten<sup>tg</sup>, esta ruta de señalización está menos activa de forma continuada por lo que hay menos señalización de los sistemas negativos de retroalimentación y esto se

traduce a la larga en un mejor funcionamiento de la señalización de la insulina. Esta mayor sensibilidad a la insulina se ha visto también en ausencia de S6K1 tras la exposición continua a HFD (Um et al., 2004) modelo en el que la ruta de PI3K/Akt/mTOR/S6K está disminuida.

### 3.7. Impacto de la sobre-expresión de Pten en el tejido adiposo marrón

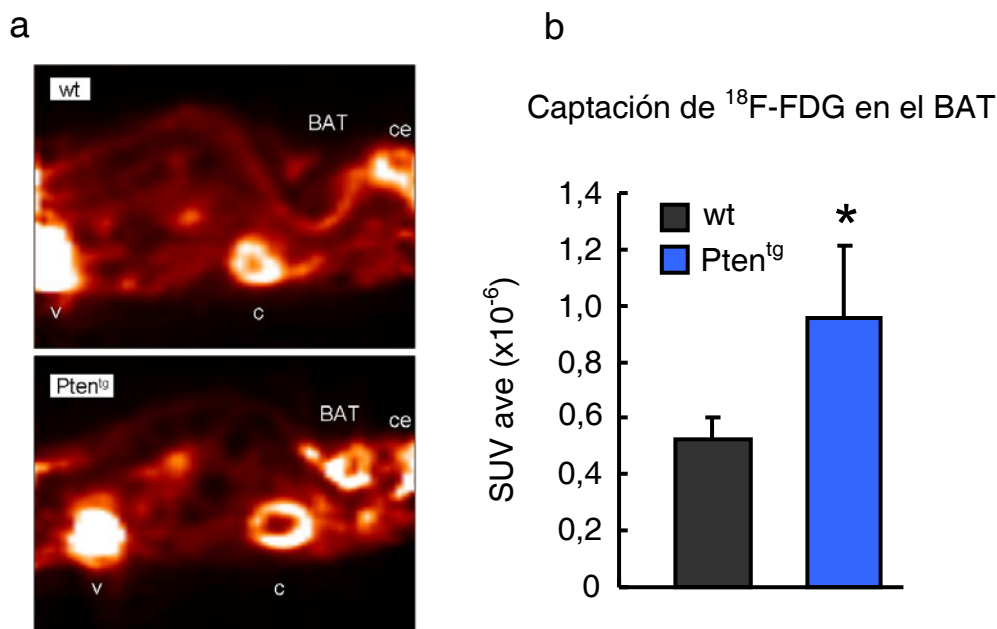
El mecanismo más eficiente para disipar energía es a través de los adipocitos marrones localizados en tejido adiposo marrón (BAT; *brown adipose tissue*) y también entre los adipocitos blancos (Kozak and Anunciado-Koza, 2008; Nedergaard and Cannon, 2010). A lo largo de los últimos años, el tejido adiposo marrón ha recobrado su importancia debido a su hallazgo de forma activa en el humano adulto (Cypess et al., 2009; Lidell and Enerback, 2010; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

En base a estas evidencias, decidimos explorar en detalle el tejido adiposo marrón de los ratones *Pten<sup>tg</sup>*. Macroscópicamente, vimos que el tejido adiposo marrón interescapular es más denso (**Figura 28a**), lo que sugiere que haya menos acumulación de lípidos. Esto se confirmó tras cortes histológicos de dicho tejido y posterior tinción con H&E (**Figura 28b**), lo que sugiere una mayor actividad lipolítica.



**Figura 28. El tejido adiposo marrón (BAT) de los ratones *Pten<sup>tg</sup>* presenta menor acumulación de lípidos** **a.** Imagen representativa del tejido marrón interescapular de ratones *wild type* (arriba) y *Pten<sup>tg</sup>* (debajo). La barra indica 1 cm. **b.** Tinción con H&E de un corte histológico del tejido adiposo marrón de los ratones *wild type* (izquierda) y *Pten<sup>tg</sup>* (derecha). La barra indica 100  $\mu$ m y 20  $\mu$ m.

Para analizar la actividad de este tejido, utilizamos la técnica de tomografía por emisión de positrones (PET). Con ella, medimos la captación de glucosa en el tejido adiposo marrón. Se observó que en el tejido adiposo marrón de los ratones *Pten<sup>tg</sup>* la captación de glucosa es mayor, sugiriendo que pudiesen tener un BAT hiperactivo. (Figura 29a y b).



**Figura 29. El tejido adiposo marrón (BAT) de los ratones *Pten<sup>tg</sup>* tienen una mayor captación de glucosa marcada ( $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa; FDG) a.** Imagen representativa de la tomografía por emisión de positrones (PET) en la que se muestra la captación de glucosa en el BAT de los ratones *wild type* (arriba) y *Pten<sup>tg</sup>* (debajo). También se indica la captación de glucosa en la vejiga (v), en el corazón (c) y en el cerebro (ce). **b.** Cuantificación de la captación de glucosa por el BAT utilizando el "valor medio de captación estándar" (SUVave; *standardized uptake value average*). Se utilizaron machos de 6 meses de edad (n=5 por genotipo). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ .

La disipación de la energía en el tejido adiposo marrón está mediada por la proteína UCP1 (Kozak and Anunciado-Koza, 2008). Consistentemente con esto, observamos que los niveles de ARN mensajero de *Ucp1* en los ratones *Pten<sup>tg</sup>* están más elevados que en los ratones *wild type* (Figura 30a). El co-activador transcripcional *Pgc1 $\alpha$*  es un regulador positivo de la expresión de *Ucp1* (Puigserver et al., 1998) y además está implicado en numerosos procesos celulares como la oxidación de los ácidos grasos (Puigserver and Spiegelman, 2003; Vega et al., 2000). En el tejido adiposo marrón de los ratones *Pten<sup>tg</sup>* se midieron los niveles de *Pgc1 $\alpha$*  y de algunos genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos (*Adipor1*, *Adipor2*, *Lcad*, *Mcad*, *Pdk4* y *Cpt1b*) y se vio que había una sobre-expresión de *Pgc1 $\alpha$*  y de algunos de los genes implicados en oxidación de ácidos grasos como *Adipor1* (*adiponectin receptor 1*), *Mcad* (*acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12*

*straight chain*), Pdk4 (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*) y Cpt1b (*carnitine palmitoyltransferase 1B*). Así pues, podemos decir que en el tejido adiposo marrón de los ratones Pten<sup>tg</sup> hay una mayor oxidación de los ácidos grasos lo que facilita que se produzca una mayor disipación de la energía en forma de calor. También se estudió la expresión de otros genes característicos del tejido adiposo marrón aunque no se observaron diferencias (Figura 30b)

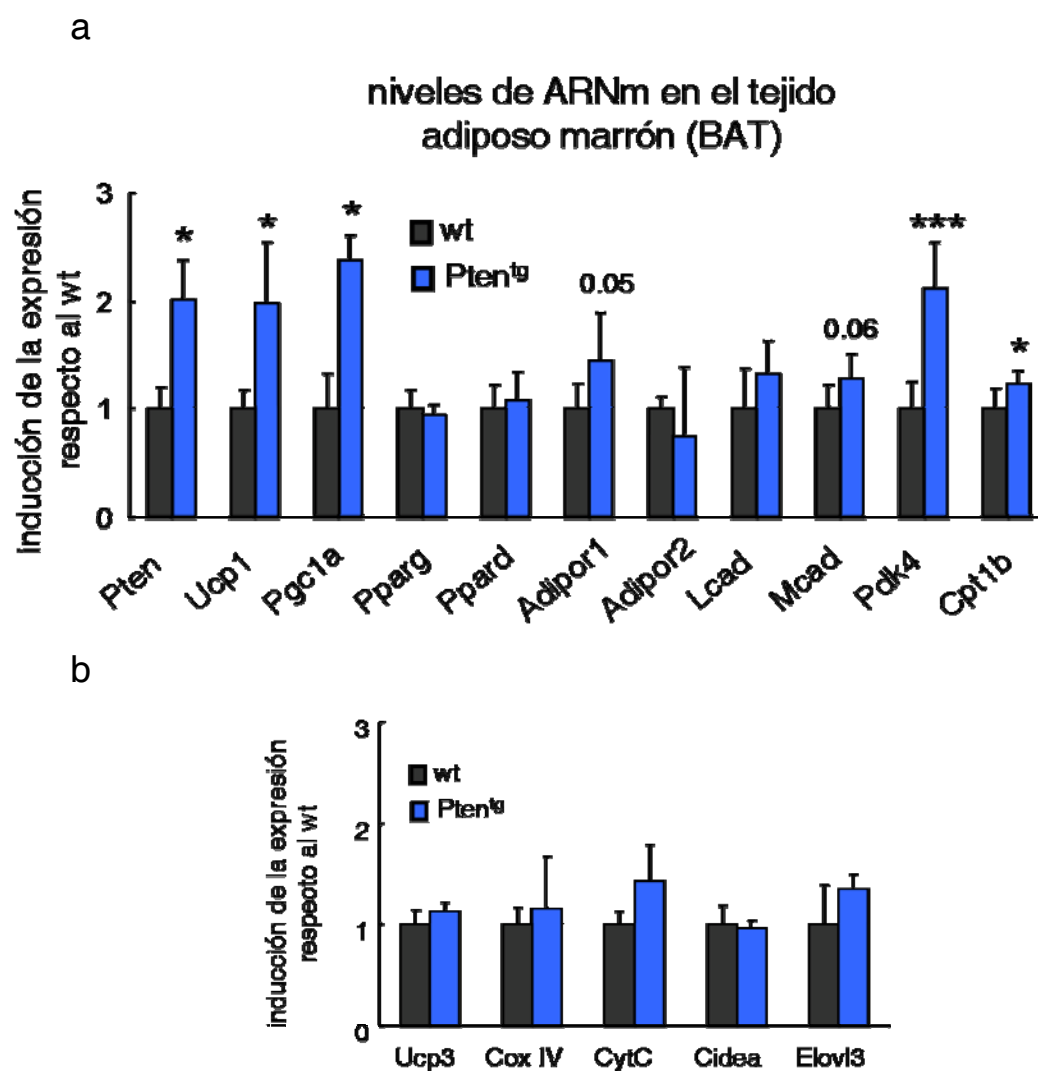


Figura 30. Aumento de los niveles de ARNm de Ucp1, Pgc1 $\alpha$  y de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en el tejido adiposo marrón (BAT) de los ratones Pten<sup>tg</sup>. a. Se representa la expresión relativa al *wild type* de los genes Pten, Ucp1, Pgc1 $\alpha$ , y de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. b. Niveles de ARNm de otros genes característicos del tejido adiposo marrón. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los genes Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  se expresan característicamente en tejido adiposo marrón pero no en tejido adiposo blanco, por lo tanto, cuando se detecta estos dos genes en el tejido adiposo blanco sugiere que en este tejido también haya adipocitos marrones (Kozak



and Anunciado-Koza, 2008; Nedergaard and Cannon, 2010). Se analizó la expresión de ARN mensajero en el tejido adiposo blanco epididimal viendo que los ratones *Pten*<sup>tg</sup> tienen una mayor expresión de los genes *Ucp1* y *Pgc1α* comparado con los *wild type* sugiriendo que hay una mayor actividad de los adipocitos marrones localizados en la grasa blanca en los ratones *Pten*<sup>tg</sup> (Figura 31)

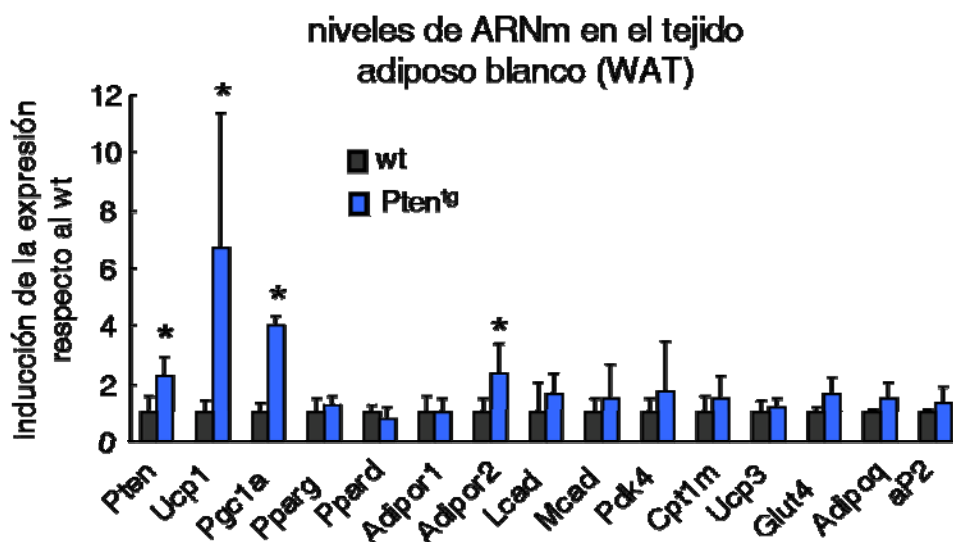
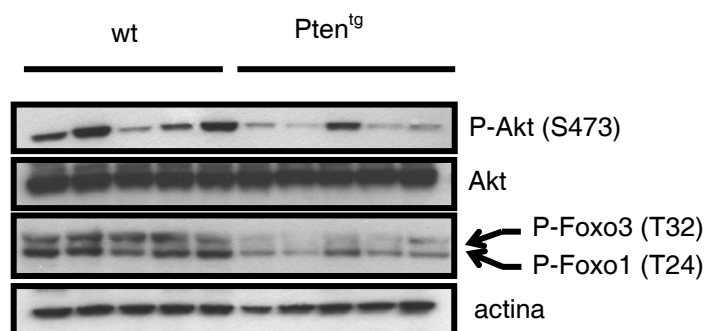


Figura 31. Aumento de los niveles de ARNm de *Ucp1* y *Pgc1α* en el tejido adiposo blanco (WAT) de los ratones *Pten*<sup>tg</sup>. Se representa la expresión relativa al *wild type* de los genes *Pten*, *Ucp1*, *Pgc1α* de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y otros genes importantes para la función del tejido adiposo blanco (WAT). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0.05$ .

En el hígado se ha demostrado que el factor de transcripción *Foxo1* interacciona con el co-activador transcripcional *Pgc1α* y es esencial para que éste desarrolle su función (Matsumoto et al., 2007; Puigserver et al., 2003); además Akt fosforila e inhibe la función de las proteínas *Pgc1α* (Li et al., 2007) y *Foxo* (Kops et al., 1999; van der Horst and Burgering, 2007). Basándonos en estas observaciones, quisimos examinar si en el tejido adiposo marrón de los ratones *Pten*<sup>tg</sup> también hay menores niveles de Akt fosforilado y por lo tanto mayores niveles de *Foxo1* y *Foxo3* activos. La inmunodetección de estas proteínas reveló que el tejido adiposo marrón de los ratones *Pten*<sup>tg</sup> tiene menor fosforilación de Akt en la S473 y además hay menos fosforilación de *Foxo1/3* lo que se traduce en tener más *Foxo 1/3* activo ya que es una fosforilación inhibitoria (Figura 32).



**Figura 32. Reducción de los niveles Akt activo en el tejido adiposo marrón.** Inmunodetección de las proteínas indicadas en extractos proteicos de tejido adiposo marrón. n=5 machos de 6 meses por genotipo.

Para estudiar en profundidad este mecanismo y cómo la inhibición de la ruta de PI3K (a través de la sobre-expresión de Pten) aumenta la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en el tejido adiposo marrón, se utilizaron distintos abordajes tanto *in vitro* como *in vivo*.

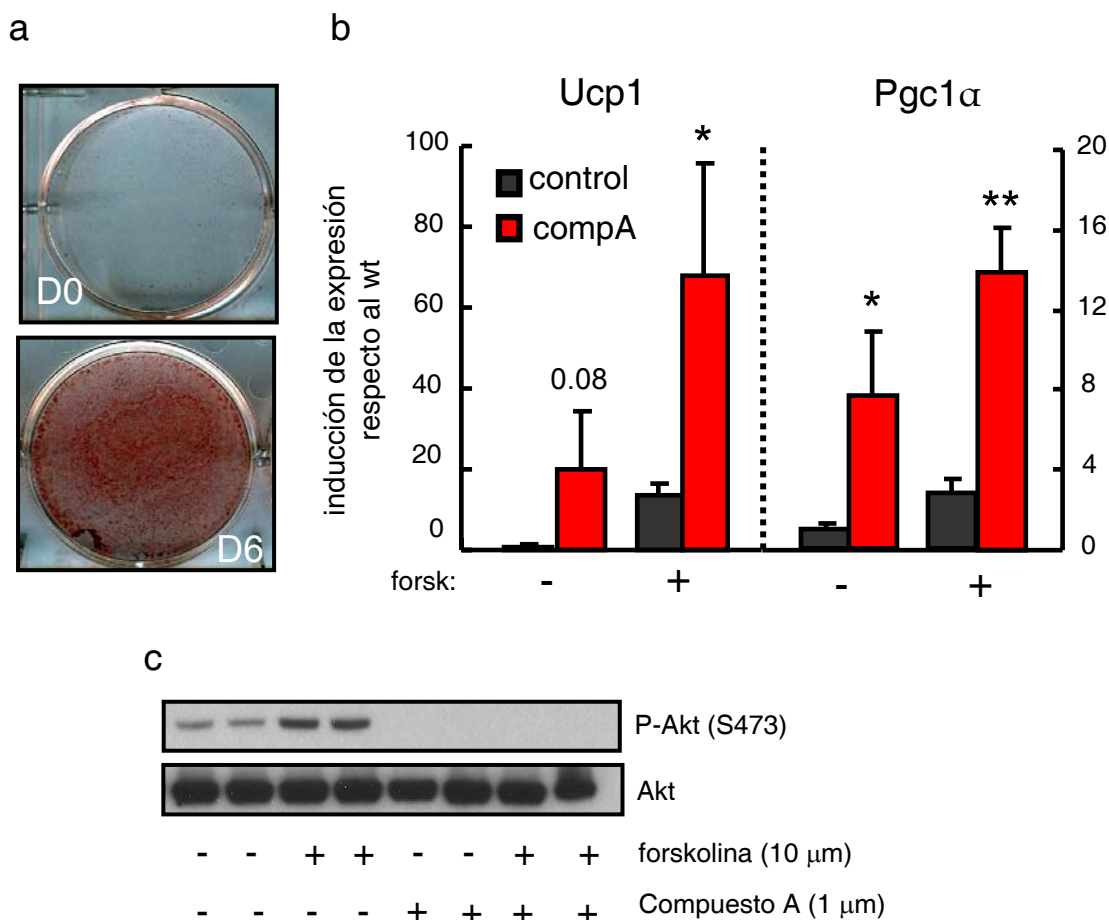
### 3.7.1. Inhibición de PI3K en líneas celulares

Para el estudio del efecto de la inhibición de la ruta de señalización de PI3K se utilizó la línea celular murina 3T3L1 que tiene características de fibroblastos embrionarios pero que bajo las condiciones adecuadas en cultivo se pueden diferenciar en adipocitos blancos.

Se ha descrito además que si se infectan estas células con el factor de transcripción Cebp $\beta$  estas células adquieren características de adipocitos marrones y son capaces de expresar Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  (Karamanlidis et al., 2007). Por tanto, se transfectaron las células 3T3L1 con el plásmido que expresaba Cebp $\beta$ . Una vez obtenidas las células 3T3L1-Cebp $\beta$ , se diferenciaron a adipocitos marrones utilizando un protocolo de diferenciación a adipocitos (se explica en detalle en Materiales y Métodos). Para comprobar que se diferenciaron de forma satisfactoria, las células se tiñieron con Oil-Red-O, colorante que tiñe las gotas de lípidos formadas durante el proceso de diferenciación (**Figura33a**). Posteriormente se trataron, con forskolina durante 4h; este compuesto es un agonista de AMPc, segundo mensajero de la señalización  $\beta_3$ -adrenérgica que estimula el tejido adiposo marrón *in vivo* tras condiciones de frío o ingesta excesiva e induce la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$ . Además, se trataron con un inhibidor de PI3K desarrollado en el CNIO que se ha llamado Compuesto A e igualmente se usó una combinación de forskolina y Compuesto A. Como se puede observar en la **Figura 33b** el tratamiento con Compuesto A (CompA) induce la



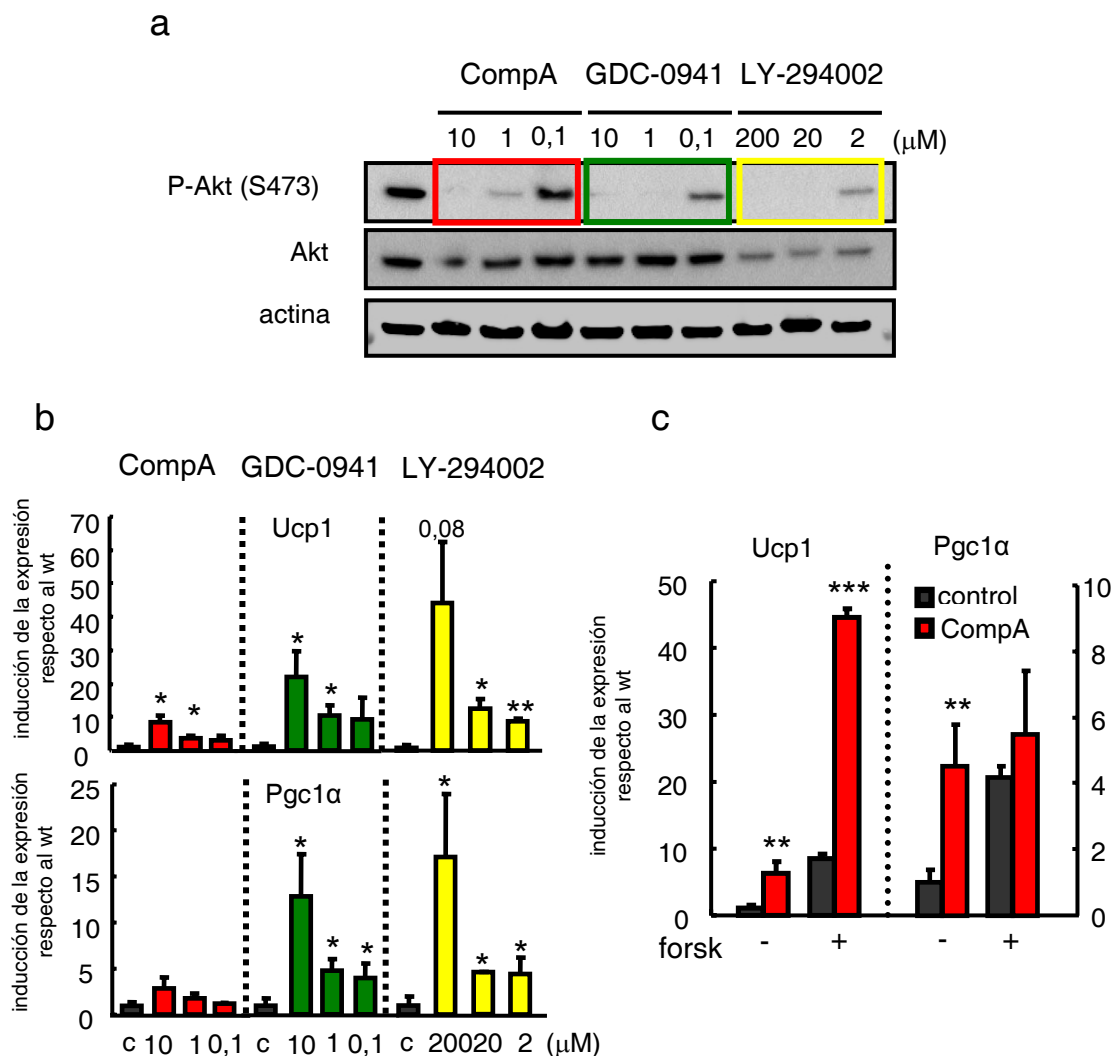
expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$ , siendo este aumento más notable cuando se combinan ambos compuestos. Por lo tanto, la inhibición de la ruta de PI3K favorece la inducción de la expresión de ARN mensajero de Pgc1 $\alpha$  y Ucp1, corroborando los datos obtenidos *in vivo*. Además se comprobó que el Compuesto A inhibe la fosforilación de Akt en S473, lo cual confirma su capacidad de bloquear la actividad de PI3K (Figura 33c).



**Figura 33. Inducción de la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en células 3T3L1-Cebp $\beta$  diferenciadas a adipocitos marrones.** **a.** Fotografía representativa de la placa de cultivo de células 3T3L1-Cebp $\beta$  a día 0 (D0, arriba) y diferenciadas (D6, debajo) teñidas con Oil-Red-O. **b.** Niveles de ARNm de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en células 3T3L1-Cebp $\beta$  diferenciadas y tratadas durante 4h con forskolina (10 $\mu$ M), con Compuesto A (1 $\mu$ M) o con ambos. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). **c.** Inmunodetección de los niveles de P-Akt (S473) después de 6 días de diferenciación y tras 4h de tratamiento con forskolina (10 $\mu$ M), con Compuesto A (1 $\mu$ M) o con ambos. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01.  $n$ =3 diferenciaciones independientes.

Este efecto del inhibidor de PI3K también se comprobó en líneas de adipocitos marrones embrionarios obtenidos por la Dra. Ángela Martínez Valverde (IIB-UAM, Madrid). En ellos se estudió el efecto de distintos inhibidores de PI3K sobre la fosforilación de Akt en S473 (Figura 34a) y sobre la expresión de ARN mensajero de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  (Figura 34b). Se vio que el efecto de inducción de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  es

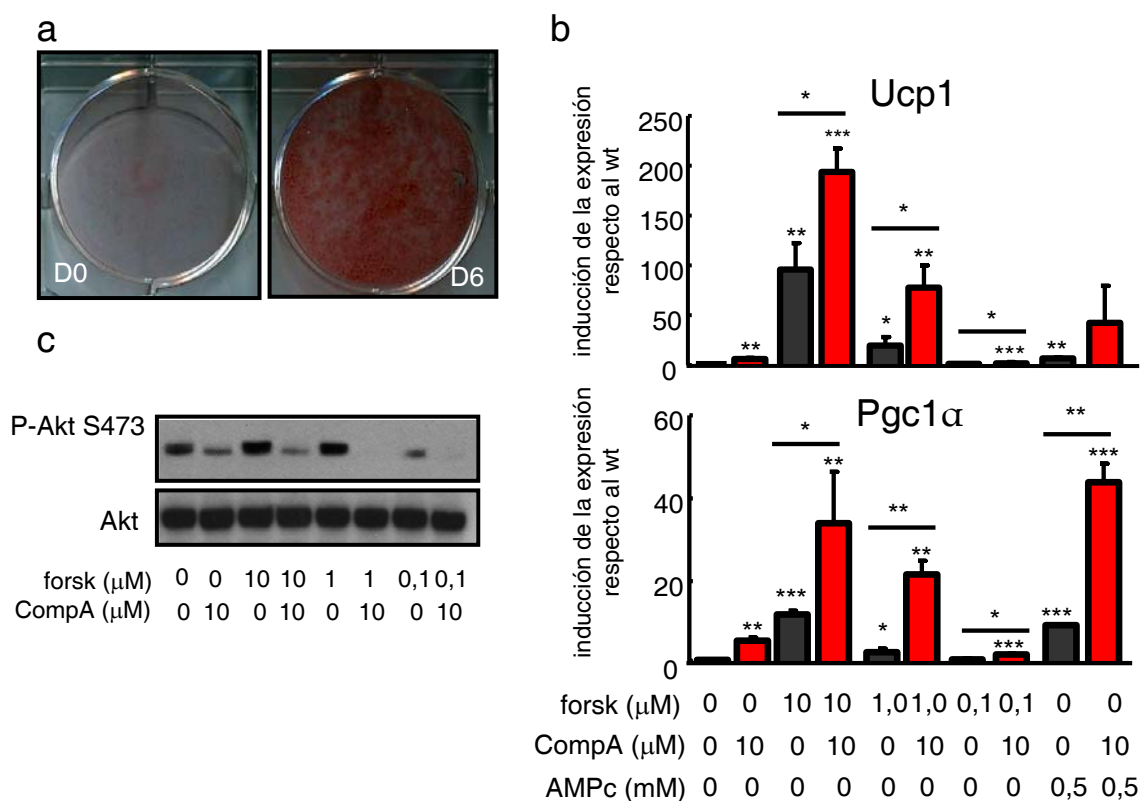
común en los inhibidores de PI3K utilizado aunque la eficiencia para inducir Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  de cada inhibidor es diferente. Posteriormente se utilizó el Compuesto A en combinación con forskolina para ver el aumento de expresión de Pgc1 $\alpha$  y Ucp1 (**Figura 34c**).



**Figura 34. Inducción de la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en pre-adipocitos marrones procedentes de ratones neonatos.** **a.** Inmunodetección de P-Akt (S473) en pre-adipocitos tras el tratamiento con el inhibidor de PI3K indicado a distintas concentraciones. **b.** Niveles de ARNm de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en pre-adipocitos tratados durante 4h con Compuesto A (10 μM, 1 μM y 0,1 μM), con GDC-0941 (10 μM, 1 μM y 0,1 μM) y con LY-294002 (200 μM, 20 μM y 2 μM). **c.** Niveles de ARNm de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en pre-adipocitos tratados durante 4h con forskolina (10 μM), Compuesto A (1 μM) o con ambos. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$  .n=3.

Para estudiar la inducción de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en adipocitos marrones, estos pre-adipocitos embrionarios también se diferenciaron con el procedimiento estándar (**Figura 35a**). Además se trataron con distintas concentraciones de forskolina induciendo de manera proporcional, Ucp1 y Pgc1 $\alpha$ . Cuando también se trata con

Compuesto A, la inducción de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  aumenta en todas las condiciones. Así mismo, se vio que utilizando cAMP (segundo mensajero de la ruta  $\beta_3$ -adrenérgica) se obtienen los mismos resultados. (**Figura 35b**). Como control, se observó la fosforilación de Akt en el residuo S473 después del tratamiento con Compuesto A y en todos los casos se vio que hay una reducción de esta fosforilación después de 4h de tratamiento (**Figura 34c**).

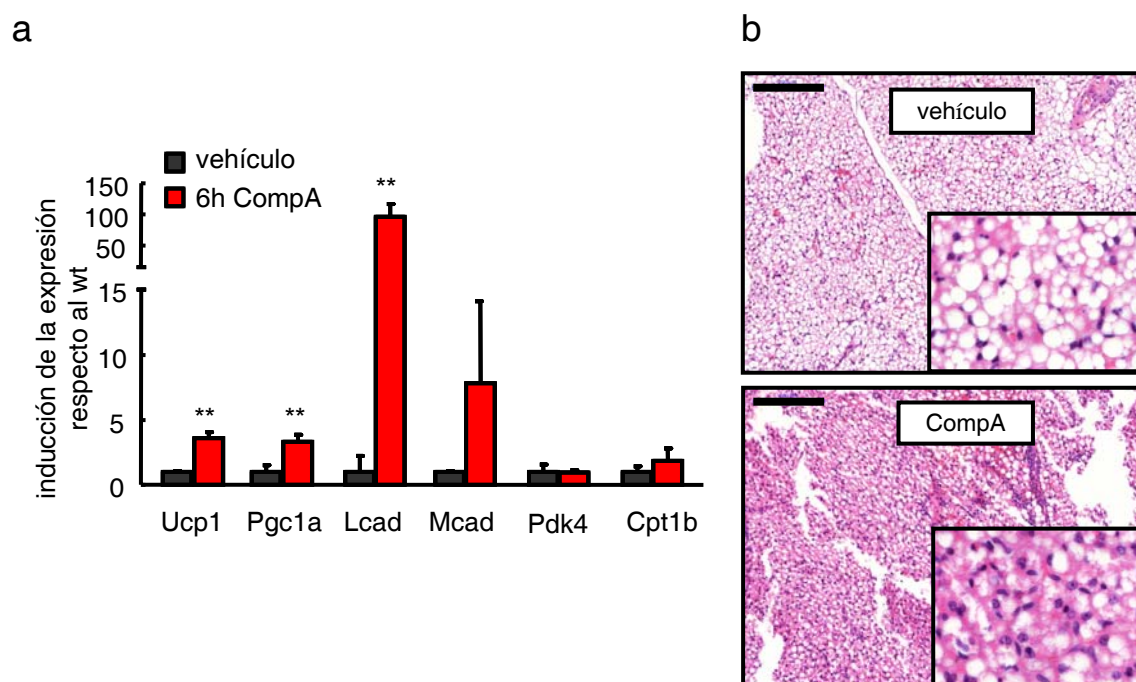


**Figura 35. Inducción de la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en adipocitos marrones diferenciados.**  
**a.** Fotografía representativa de la placa de cultivo de pre-adipocitos marrones a día 0 (D0, izquierda) y de adipocitos diferenciados (D6, derecha) teñidas con Oil-Red-O. **b.** Niveles de ARNm de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en adipocitos marrones tratados durante 4h con forskolina (10  $\mu$ M), con Compuesto A (10  $\mu$ M) o con ambos tras la diferenciación. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . (n=3). **c.** Inmunodetección de P-Akt (S473) en adipocitos marrones tras el tratamiento con forskolina (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) y Compuesto A (10  $\mu$ M).

Por tanto hemos visto que utilizando líneas de adipocitos marrones (3T3L1-Cebp $\beta$  y adipocitos embrionarios sin diferenciar o diferenciados) se consigue demostrar que la inhibición de la ruta de PI3K produce un aumento en la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en el tejido adiposo marrón.

### 3.7.2. Inhibición de PI3K *in vivo*

Para afianzar las observaciones *in vitro*, tratamos también ratones *wild-type* con el inhibidor PI3K desarrollado en el CNIO (Compuesto A). Después de 6h de tratamiento con una dosis de 15mg/kg, sacrificamos los ratones y medimos los niveles de ARNm de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en BAT, así como algunos genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Vimos que hubo un aumento de la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en los ratones tratados con Compuesto A en comparación con los ratones tratados con vehículo (**Figura 36a**), al igual que una inducción de la expresión de Lcad (*long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase*), implicado en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Además se observó que en el tejido adiposo marrón de los ratones tratados con el inhibidor de PI3K había menos acumulación de lípidos que en el tejido adiposo marrón de los ratones tratados con vehículo (**Figura 36b**).



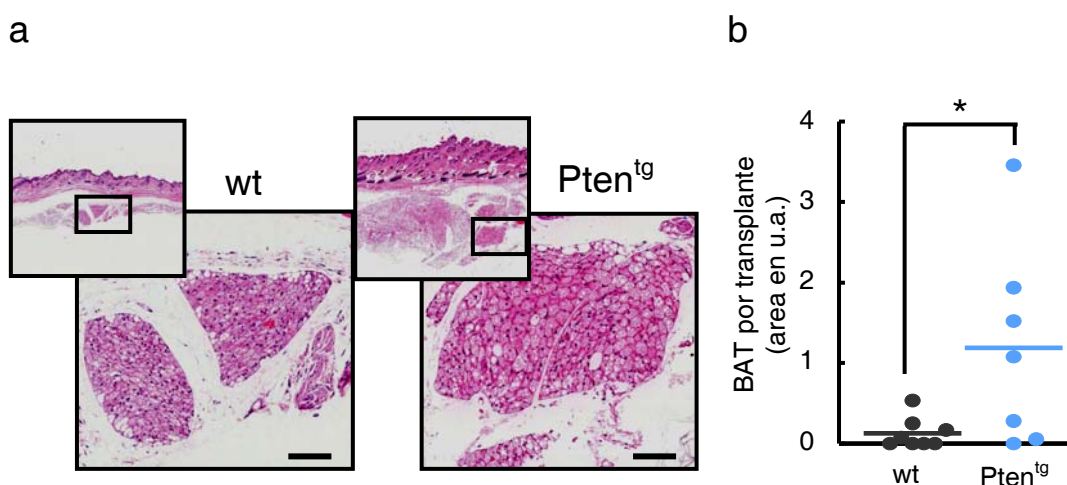
**Figura 36. Inducción de la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en ratones tratados con Compuesto A.**  
**a.** Niveles de ARNm de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  y otros genes implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en tejido adiposo marrón tras 6h de tratamiento con Compuesto A (15mg/kg). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .  $n = 3$  ratones por grupo de 3 meses de edad.  
**b.** Análisis histológico del tejido adiposo marrón después de 6h de tratamiento con vehículo o con Compuesto A. La barra representa 200  $\mu$ m.

Estos resultados tanto *in vitro* como *in vivo* indican que los efectos observados al sobreexpresar Pten en BAT se deben a la inhibición de la función de PI3K.

### 3.7.3. Generación de tejido adiposo marrón ectópico a partir de fibroblastos embrionarios

Para seguir estudiando el efecto del aumento de expresión de Pten en el tejido adiposo marrón, estudiamos la capacidad de los MEFs *Pten*<sup>tg</sup> de generar tejido adiposo marrón ectópico. Basados en la publicación del laboratorio de B. Spiegelman (Kajimura et al., 2009) en la que reprograman fibroblastos embrionarios (MEFs) a adipocitos marrones infectando los MEFs con los factores de transcripción *Prdm16* y *Cebpβ* y son capaces de generar tejido adiposo marrón al transplantarlo en ratones, nosotros nos preguntamos qué papel tendría la sobre-expresión de PTEN en todo este proceso.

Se reprogramaron MEFs inmortalizados *Pten*<sup>tg</sup> y *wild type* y se inyectaron de forma subcutánea en ratones desnudos. Después de dos meses, se vio que había aparecido tejido adiposo marrón ectópico en los sitios de inoculación. Se cuantificó el área de los depósitos de tejido adiposo marrón formados y se vio que el tejido adiposo marrón ectópico procedente de los MEFs *Pten*<sup>tg</sup> era más grande, concluyendo que estas células eran más eficientes a la hora de generar tejido adiposo marrón que las células *wild type* (Figura 37a y b)



**Figura 37. Generación de tejido adiposo marrón ectópico.** **a.** Imagen representativa de tejido adiposo marrón ectópico formado con células *wild type* (izquierda) o con células *Pten*<sup>tg</sup> (derecha). Las barras representan 200  $\mu$ m. **b.** Cuantificación del tejido adiposo marrón formado después de 2 meses de la inyección subcutánea de MEFs *Prdm16/Cebpb wild type* o *Pten*<sup>tg</sup>. Cada valor corresponde al área de tejido adiposo marrón formado en unidades arbitrarias (u.a.) por sitio de inyección (n=8 inoculaciones de células *wild type* y n=7 inoculaciones de células *Pten*<sup>tg</sup>). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \*p<0,05.

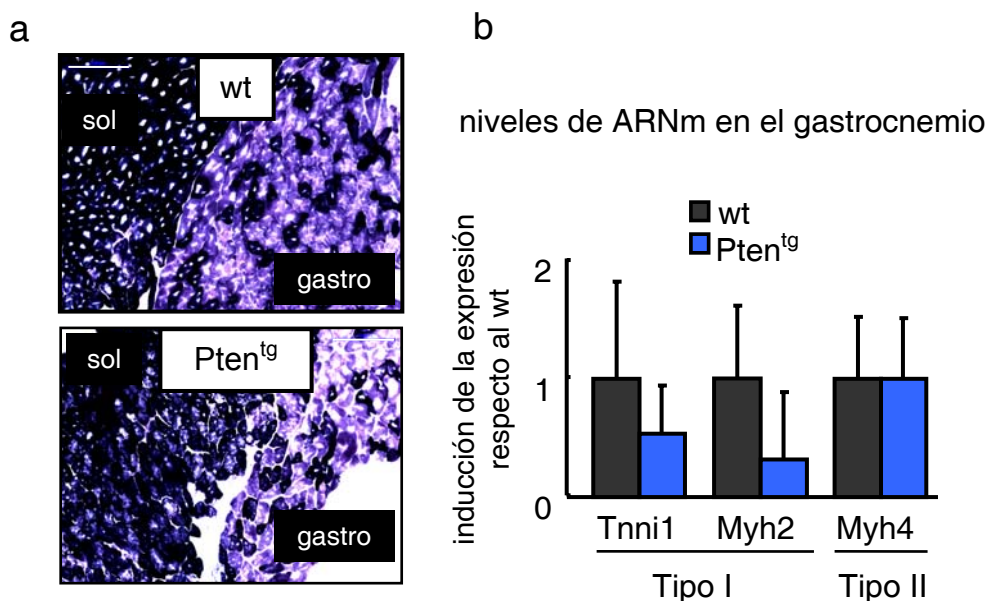
Todos estos resultados confirman que la sobre-expresión de Pten activa la expresión de *Ucp1*, y por lo tanto la disipación de energía, de una manera intrínseca en los

adipocitos marrones, pudiéndose recapitular *in vitro* o en transplantes en huéspedes wt.

### 3.8. Impacto de la sobre-expresión de Pten en el músculo

Junto con el tejido adiposo marrón, el músculo es otro tejido responsable del gasto energético. En concreto, la sobre-expresión de Pgc1 $\alpha$  o la utilización de compuestos que activan a Pgc1 $\alpha$  a través de Sirt1 inducen un cambio en la fibras musculares de tipo II (capacidad oxidativa baja) a fibras musculares de tipo I (capacidad oxidativa alta) (Feige et al., 2008; Lin et al., 2002b) y en algunos casos esto se ha asociado con un mayor gasto energético (Feige et al., 2008). Por ello, examinamos la actividad succinato deshidrogenasa (SDH), que se usa comúnmente para diferenciar tipos de fibras musculares basándose en su potencial oxidativo. La enzima SDH se localiza en la membrana interna de la mitocondria y cataliza la oxidación del ácido succínico en ácido fumárico en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Las fibras musculares con un potencial oxidativo alto, poseen un gran número de mitocondrias y por ello se tiñen intensamente mientras que las fibras no oxidativas con un bajo contenido mitocondrial se teñirán levemente. Utilizamos secciones del músculo gastrocnemio para realizar la tinción ya que posee ambos tipos de fibras musculares. Como se puede observar en la **Figura 38a** no existe un aumento del número de fibras musculares de tipo I de alto potencial oxidativo. Así mismo, medimos los niveles de ARNm característicos de las fibras musculares de tipo I (**Figura 38b**) y los resultados demuestran que los ratones Pten<sup>tg</sup> no tienen un aumento de este tipo de fibras musculares y por tanto el aumento de gasto energético observado en los ratones Pten<sup>tg</sup> es debido a una actividad mayor en el tejido adiposo marrón.





**Figura 38. En el músculo de los ratones Pten<sup>tg</sup> no hay mayor número de fibras oxidativas tipo I.** a. Análisis histoquímico de la actividad SDH en el músculo soleo (sol) y gastrocnemio (gastro) de los ratones wt (arriba) y Pten<sup>tg</sup> (debajo). Las fibras positivas para SDH corresponden a las fibras tipo I. La barra representa 200 μm. b. Niveles de ARNm de los marcadores de las fibras tipo I y tipo II en el gastrocnemio. n=4 machos por genotipo de 1,5-2 años de edad. Las barras representan la media ± desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. p>0,05 en todos los genes estudiados.

#### 4. Estudio del efecto de los inhibidores de PI3K sobre obesidad

La obesidad se desarrolla cuando la ingesta de energía supera al gasto energético. Después de la ingesta de nutrientes, una pequeña proporción se pierde en las heces y orina, otra proporción es utilizada para necesidades fisiológicas tales como crecimiento, embarazo y lactancia, otra se utiliza para la actividad física y la mayoría de esta energía posterior a la ingesta es utilizada en procesos metabólicos o se pierde en forma de calor. Actualmente para tratar la obesidad, las terapias se centran en la dieta y el ejercicio, en reducir la ingesta y la absorción por parte del organismo e incluso cirugía para los individuos con obesidad extrema. Desafortunadamente, sólo una pequeña proporción de individuos sometidos a programas dietéticos o de ejercicio pierden peso (Wing and Phelan, 2005). Se han aprobado tres medicamentos para reducir la ingesta de energía ya sea actuando sobre los centros de saciedad del cerebro o reduciendo la absorción intestinal, aunque sus efectos secundarios no deseados y el tratamiento prolongado sin obtener resultados favorables, han limitado su éxito (Melnikova and Wages, 2006).

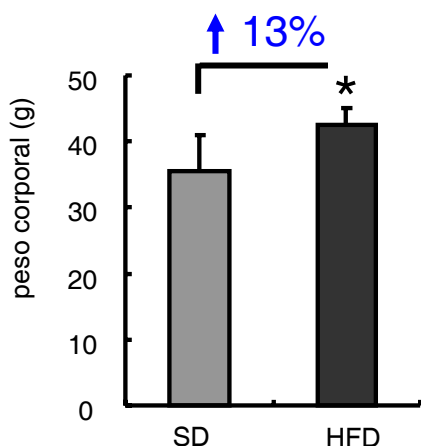
Sin embargo, dirigir los tratamientos a aumentar el gasto energético es una estrategia alternativa y algunas drogas dirigidas a esta función ya están disponibles como los agonistas de los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos (Arch, 2008) o compuestos como el resveratrol que activa a Sirt1 (Yamamoto et al., 2007), AICAR y metformina que activan a AMPK (*AMP-activated protein kinase*) o desacopladores de la oxidación mitocondrial como el 2,4-dinitrofenol (DNP) que produce aumento del gasto energético y asociado con pérdida de peso (Harper et al., 2008) aunque esta droga posee efectos secundarios que no permite ser utilizado como terapia. El reciente descubrimiento de que los humanos adultos poseen tejido adiposo marrón activo (Cypess, 2009; Marken Lichtenbelt, 2009; Saito, 2009; Virtanen, 2009; Zingaretti, 2009), ha abierto la posibilidad de que este tejido especializado en gastar energía sea una diana terapéutica eficaz y segura para el tratamiento de la obesidad.

Nuestros resultados previamente descritos indican que la inhibición de PI3K debido a la sobre-expresión de Pten en todo el organismo, incluyendo el tejido adiposo marrón conducen a un aumento de gasto energético debido a una mayor actividad de dicho tejido adiposo marrón, efecto que también se puede observar en los adipocitos marrones *in vitro*. Nos preguntamos ahora si el uso de inhibidores de PI3K podría ser un buen tratamiento para reducir la obesidad.

#### 4.1. Efecto de la inhibición de PI3K por el Compuesto A en obesidad

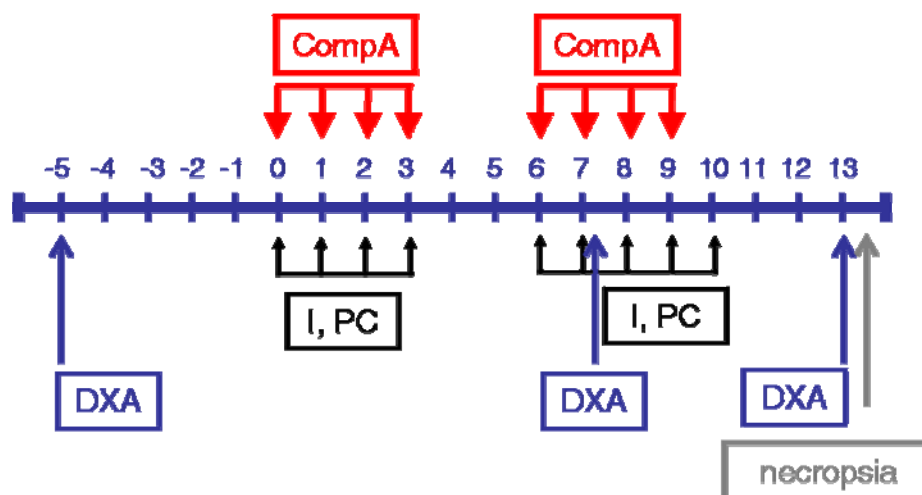
En una primera aproximación, utilizamos el inhibidor de PI3K desarrollado en el CNIO (Compuesto A) para tratar ratones obesos y estudiar si existía algún efecto de este inhibidor sobre la obesidad. Para ello utilizamos ratones obesos alimentados durante 8 meses con dieta rica en grasa (HFD). Después de estos ocho meses, estos ratones tenían un sobrepeso del 13% comparado con ratones control alimentados con dieta estándar (SD) (**Figura 39**).





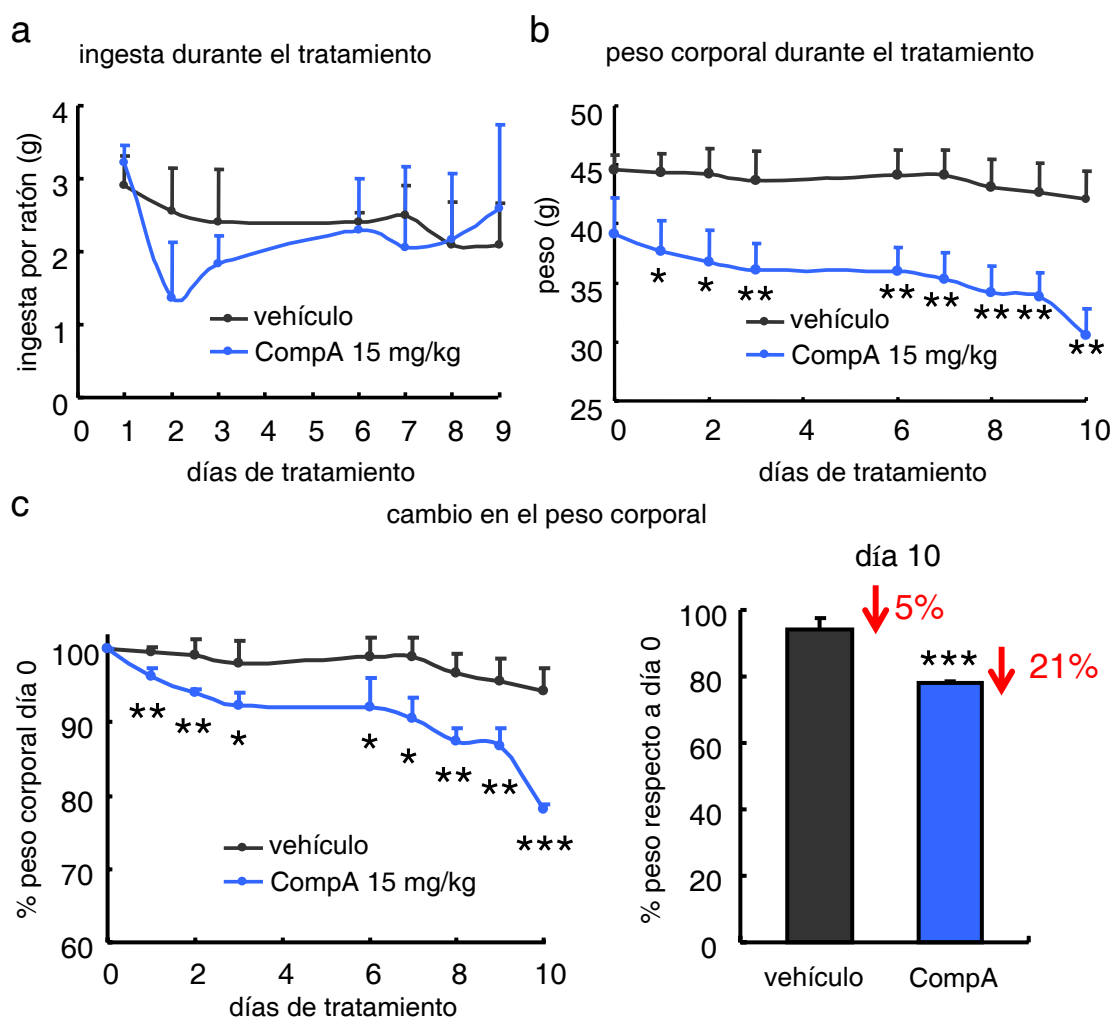
**Figura 39. Sobrepeso de los ratones tras 8 meses tratados con HFD.** Se pesaron los ratones tras 8 meses en HFD. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ .  $n=8$  machos por grupo.

Siguiendo el esquema de la **Figura 40**, tratamos con una dosis de 15mg/kg de Compuesto A a los ratones obesos durante dos semanas, 4 días a la semana. Esta dosis se utilizó ya que estudios previos realizados en el Programa de Terapias Experimentales determinaron que dicha dosis produce una sustancial inhibición de PI3K y que su concentración en sangre es de 5-10 veces la IC<sub>50</sub> de la inhibición de P-AKT al menos pasadas 10 horas después del tratamiento y no afecta al peso corporal de animales alimentados con dieta estándar. Antes del tratamiento (día -5), durante (día 7) y después (día 13) medimos la adiposidad de los ratones obesos utilizando densitometría (DXA). También durante el tratamiento medimos la ingesta de comida (I) y los ratones fueron pesados todos los días (PC) para monitorizar la ganancia o pérdida de peso durante todo el tratamiento.



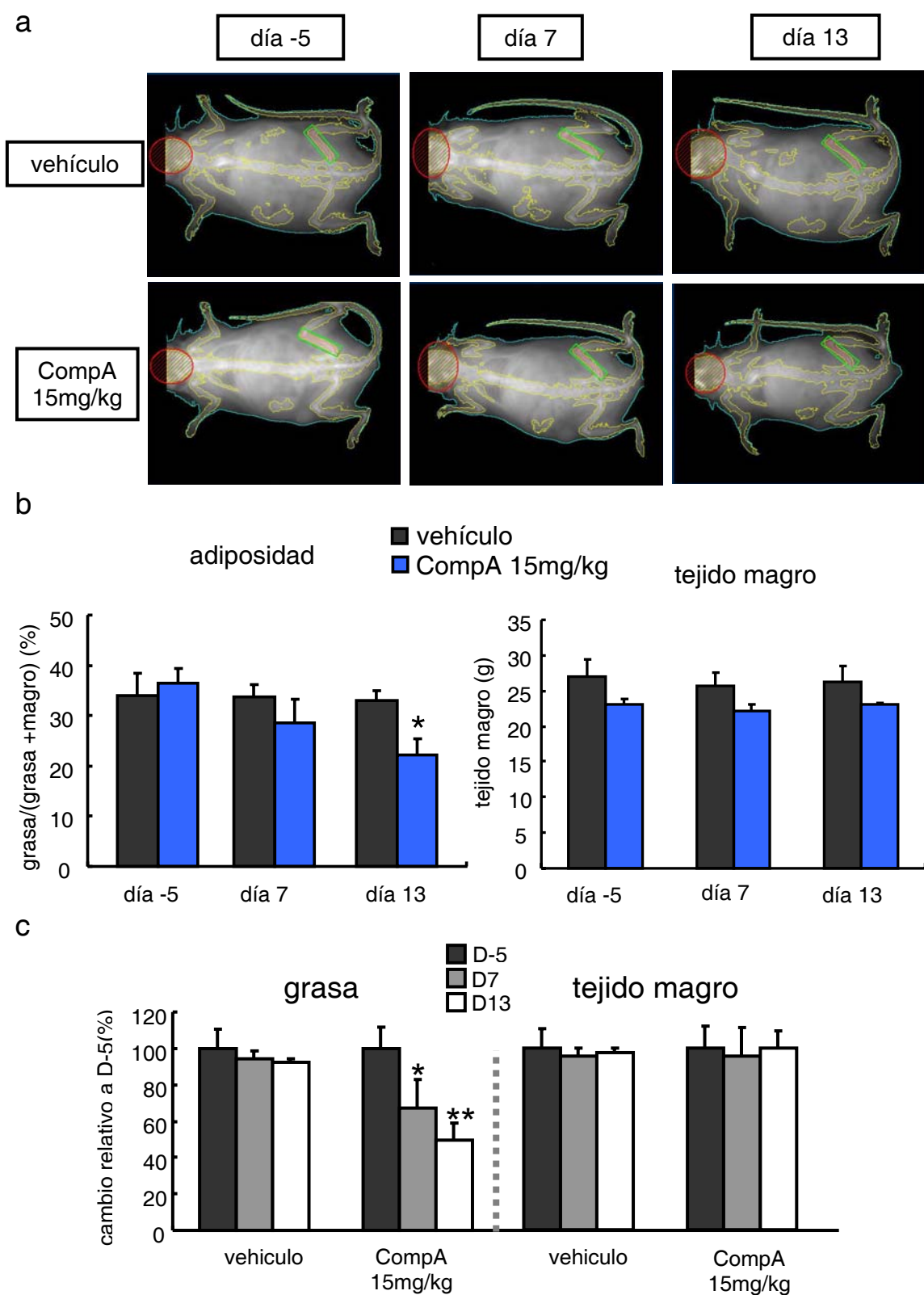
**Figura 40. Esquema del tratamiento con 15 mg/kg de Compuesto A a los ratones obesos durante dos semanas.** Los ratones fueron tratados con 15 mg/kg de Compuesto A durante 4 días cada semana a lo largo de dos semanas. Antes del tratamiento, durante y después se midió la adiposidad por densitometría (DXA). Durante el tratamiento se monitorizó la ingesta de comida (I) y el peso corporal (PC). El día 13 se realizaron las necropsias de los animales tratados.

Como se puede observar en la **Figura 41**, durante las dos semanas que duró el tratamiento, los ratones tratados con el Compuesto A tuvieron una ingesta equivalente a los ratones tratados con vehículo (**Figura 41a**). Sin embargo, los ratones tratados con este inhibidor de PI3K perdieron peso durante las dos semanas de tratamiento llegando a un 21% de pérdida (**Figura 41b y c**).



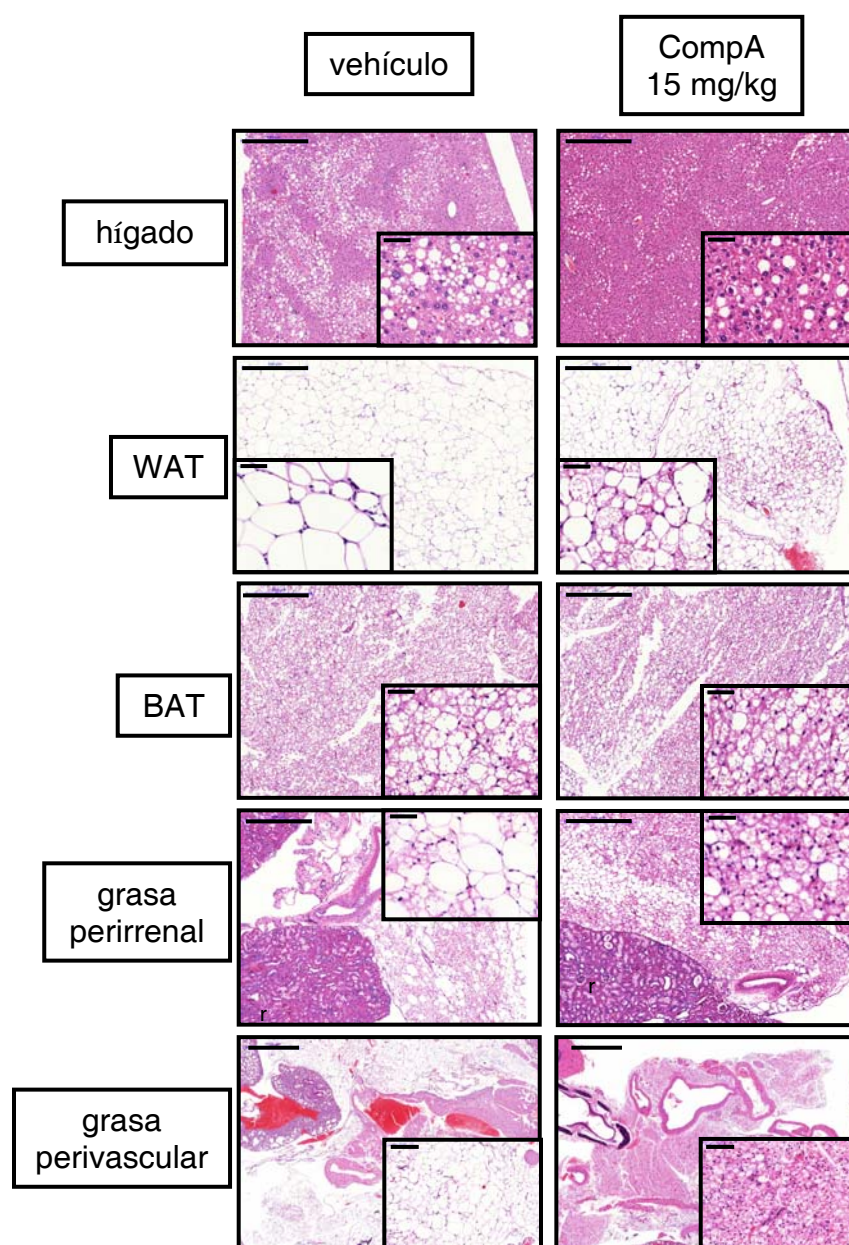
**Figura 41. Medidas de ingesta de comida y peso de los ratones tratados con Compuesto A durante dos semanas.** a. Peso de la comida ingerida por ratón durante la duración del tratamiento. b. Peso de los ratones tratados con vehículo o Compuesto A durante el tratamiento. c. Porcentaje de cambio en el peso corporal respecto al día 0 en los ratones tratados con vehículo o con Compuesto A durante el tratamiento (izquierda) y a día 10 (derecha). Las barras y puntos representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .  $n = 4$  machos por grupo.

Esta pérdida de peso también queda reflejada en la densitometría, donde se observa que los ratones tratados pierden adiposidad sin perder tejido magro igualando la adiposidad que de media poseen los ratones alimentados con dieta estándar (**Figura 42a, b y c**).



**Figura 42. Estudio de la adiposidad de los ratones tratados con Compuesto A.** a. Fotografías representativas de las densitometrías realizadas a día -5, 7 y 13 de un ratón tratado con vehículo y de otro ratón tratado con Compuesto A. b. Resultado de la densitometría en la que se representa el porcentaje de grasa respecto a la suma de los pesos de grasa y magro (izquierda) y el peso del tejido magro(derecha). c. Cambio relativo de peso de la grasa y tejido magro con respecto al día -5. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . n=4 machos por grupo.

Después de la necropsia y posterior análisis histológico de los tejidos, se observó que en el tejido adiposo blanco de los ratones tratados con PI3K aparecían adipocitos marrones, proceso conocido como “*browning*” (**Figura 43**); así mismo, se observó que en el hígado, la esteatosis característica de los ratones alimentados con dieta rica en grasa estaba muy reducida en comparación con los ratones tratados con vehículo y el propio tejido adiposo marrón presentaba menos acumulación de lípidos. También se observó alrededor de corazón y riñón, menos acumulación de grasa y además aparecía más adipocitos marrones en la grasa que rodean los vasos principales y el riñón.

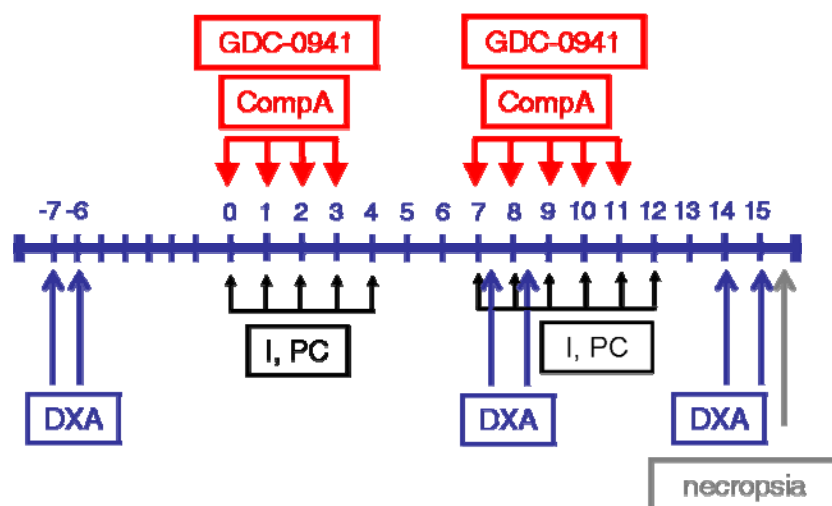


**Figura 43. Análisis histológico de los tejidos de los ratones tratados con Compuesto A.**

Tinción con H&E del tejido adiposo blanco (WAT), del hígado, del tejido adiposo marrón (BAT). Las barras de hígado, WAT, BAT, y grasa perirrenal representan 500µm para las imágenes de menor aumento y 50 µm para las de mayor aumento. En el caso de la grasa perivascular, las barras corresponde a 1cm o a 100 µm respectivamente. r: riñón.

## 4.2. Efecto de la inhibición de PI3K por el Compuesto A y GDC-0941 en obesidad

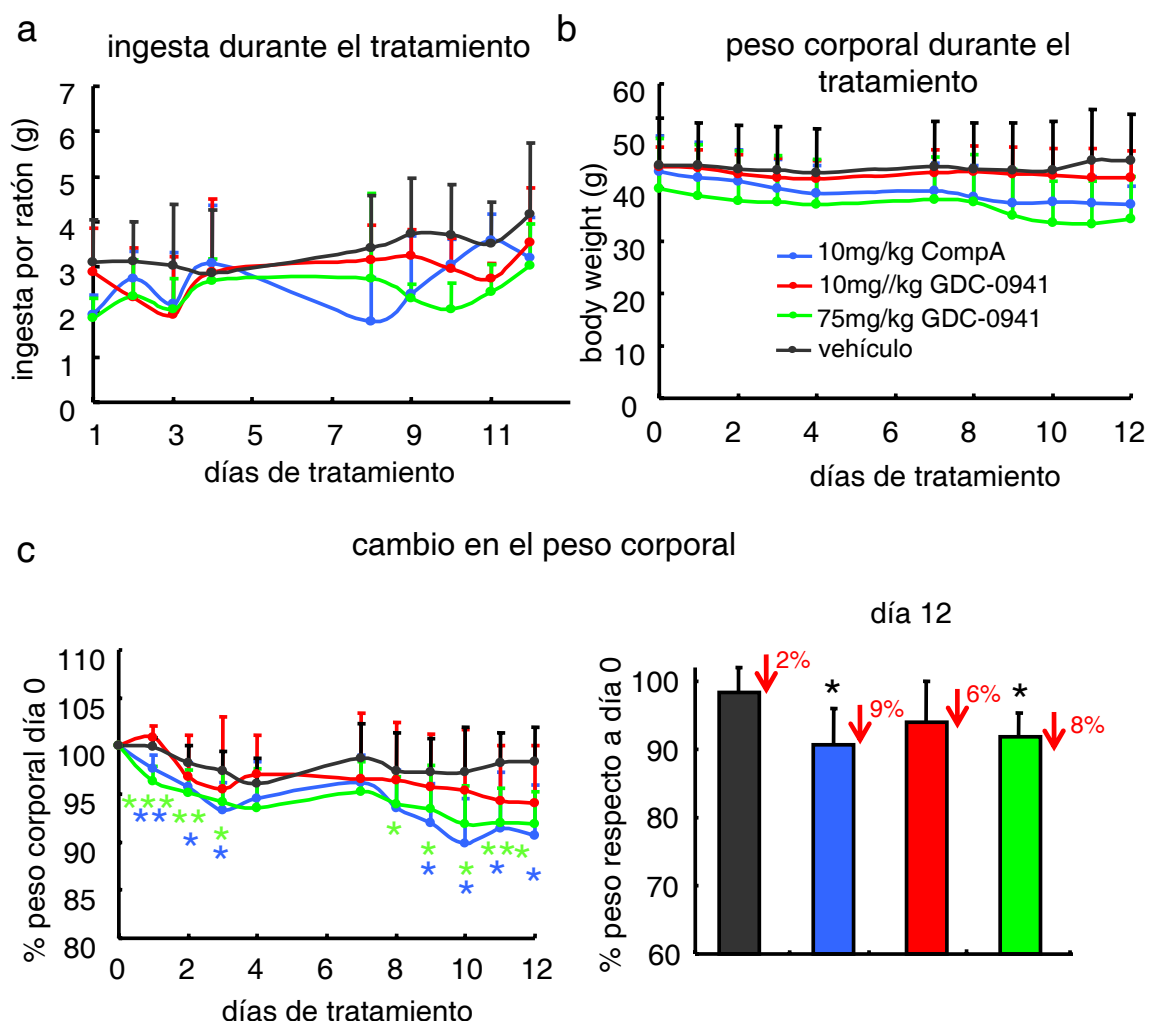
Después de los resultados obtenidos con el Compuesto A, decidimos repetir el experimento con una dosis más baja de este compuesto ya que con 15mg/kg de Compuesto A, la pérdida de peso era muy acelerada. En este ensayo utilizamos una dosis de 10mg/kg y además probamos otro compuesto comercial que inhibe PI3K (GDC-0941) (Folkes et al., 2008), para comparar los efectos de ambas drogas y poder concluir que este efecto de pérdida de peso es común a los inhibidores de PI3K y no sólo al Compuesto A. Utilizamos también dos dosis de GDC-0941, 10mg/kg y 75mg/kg, recomendadas por el departamento de Terapias Experimentales del CNIO, ya que este compuesto es menos eficiente que el Compuesto A *in vivo*. Planteamos el mismo esquema de administración de ambos compuestos y monitorizamos durante las dos semanas de tratamiento el peso (PC) y la ingesta (I) (Figura 44).



**Figura 44. Esquema del tratamiento con Compuesto A y GDC-0941.** Los ratones fueron tratados con 10mg/kg de Compuesto A y con GDC-0941 (10mg/kg y 75mg/kg) durante 4 días la primera semana y 5 días la segunda semana. Antes del tratamiento, durante y después se midió la adiposidad por densitometría (DXA). Durante el tratamiento se monitorizó la ingesta de comida (I) y el peso corporal (PC). A día 15 se realizaron las necropsias de los animales tratados.

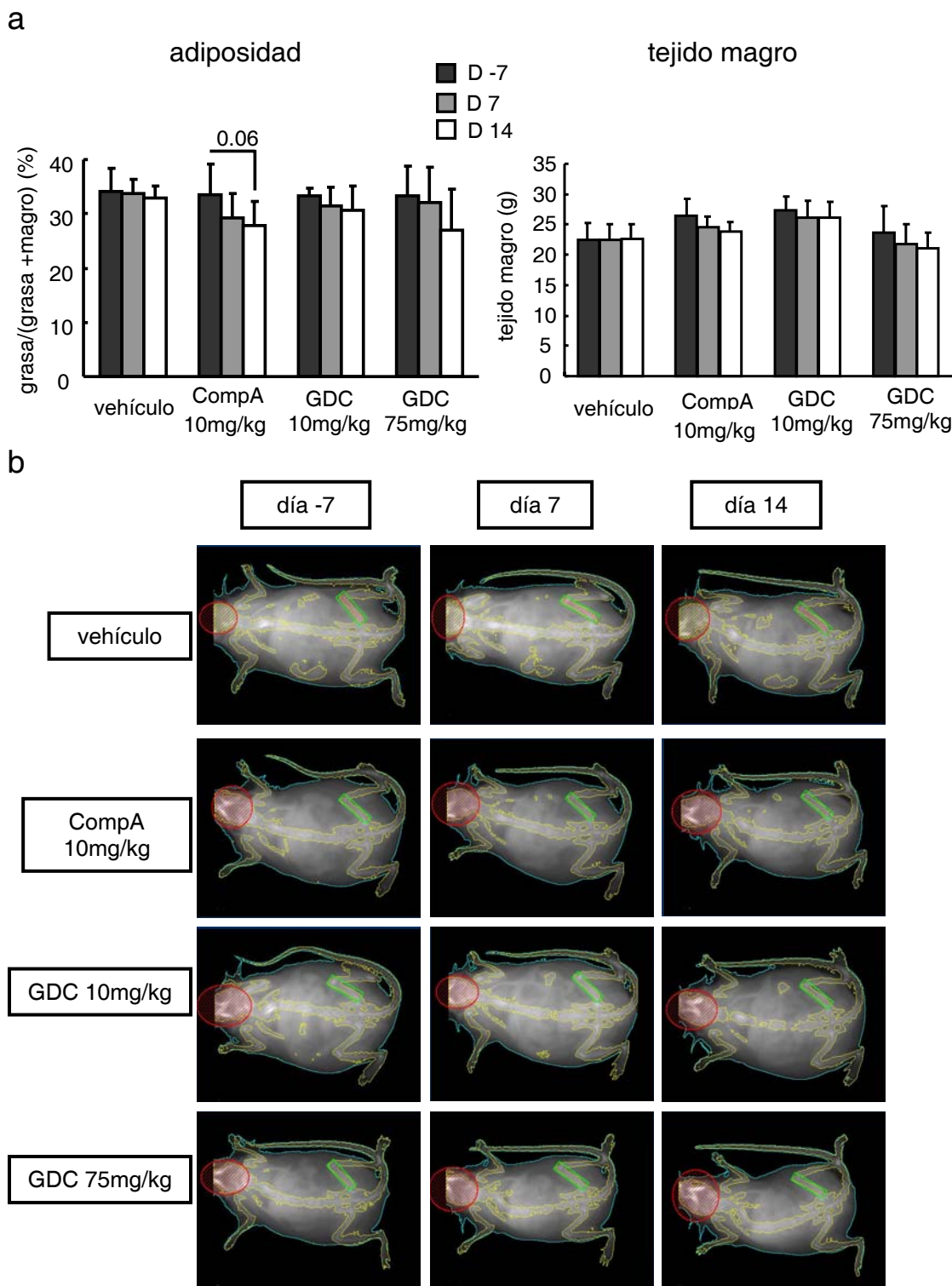
Durante el tratamiento, todos los grupos experimentales ingirieron la misma cantidad de comida (Figura 45). Sin embargo, los ratones tratados con Compuesto A 10mg/kg y los ratones tratados con GDC-0941 75mg/kg tuvieron una pérdida de peso del 9% y del 8% respectivamente. Tanto los ratones tratados con vehículo como los ratones tratados con GDC-0941 10mg/kg, no tuvieron una pérdida de peso significativa con respecto a día cero del tratamiento.





**Figura 45. Medidas de ingesta de comida y peso de los ratones tratados con Compuesto A y GDC-0941 durante dos semanas.** a. Peso de la comida ingerida por ratón durante el tratamiento. b. Peso de los ratones tratados con vehículo, con Compuesto A 10mg/kg o con GDC-0941 10mg/kg o 75mg/kg durante el tratamiento. c. Porcentaje de cambio durante el tratamiento (izquierda) del peso corporal respecto al día 0 en los ratones tratados con vehículo, Compuesto A, o con GDC-0941 10mg/kg o 75mg/kg y a día 12 (derecha). Las barras y puntos representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .  $n = 4-6$  machos por grupo.

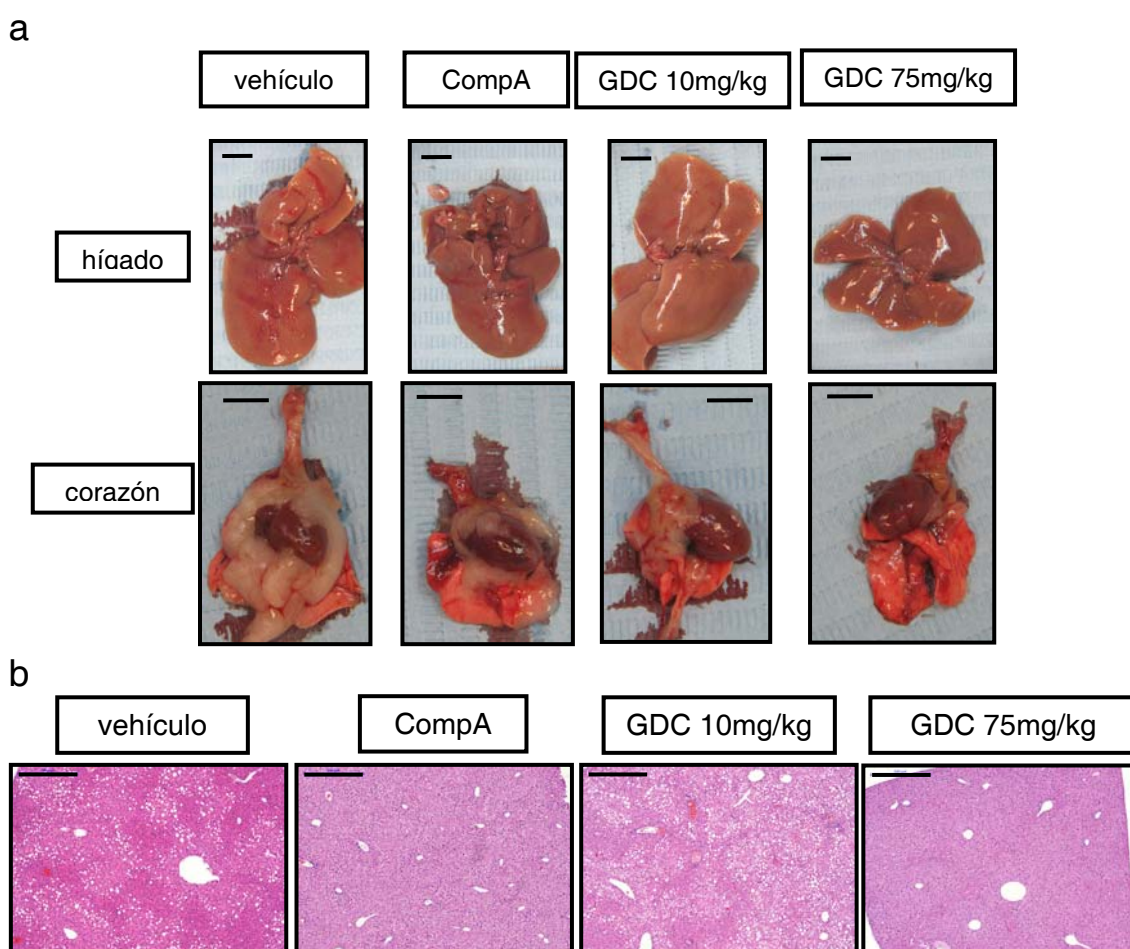
Por densitometría se observó que los ratones tratados con Compuesto A 10mg/kg redujeron su adiposidad desde un 33,5% (día -7) a un 27% al final del tratamiento (6,5% de diferencia) aunque este cambio no es significativo ( $p = 0,06$ ) con respecto a la adiposidad medida antes del tratamiento. Los ratones tratados con GDC-0941 75mg/kg redujeron su adiposidad en un 6,3% (de 33,3% a 27%) aunque este cambio tampoco fue estadísticamente significativo ( $p = 0,09$ ). Los tratados con vehículo y con GDC-0941 10mg/kg apenas tuvieron cambio significativos en su adiposidad (sólo un 2%) respecto al día 0. Igual que en el estudio anterior, no se observaron cambios en el tejido magro durante el tratamiento (**Figura 46ay b**).



**Figura 46. Estudio de la adiposidad de los ratones tratados con Compuesto A y GDC-0941. a.** Resultado de las densitometrías realizadas a día -7, 7 y 14 de tratamiento en la que se representa el porcentaje de grasa respecto a la suma de los pesos de grasa y magro (izquierda) y el peso del tejido magro (derecha). **b.** Fotografías representativas de las densitometrías realizadas a día -7, 7 y 14 de un ratón tratado con vehículo, uno tratado con Compuesto A 10mg/kg, uno tratado con GDC-0941 10mg/kg y otro tratado con GDC-0941 75mg/kg. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). No se encontró significancia estadística calculada con la prueba t de Student. ( $p > 0,05$ );  $n = 4-6$  machos por grupo.

Aunque la reducción de adiposidad no fue estadísticamente significativa, sí hay una tendencia, por lo que será necesario repetir el experimento con más ratones.

Tras la necropsia se observó menos acumulación de grasa en los ratones tratados con Compuesto A 10mg/kg y en los tratados con GDC 0941 75mg/kg tanto en la grasa epididimal (no se muestra), en el tejido adiposo marrón (no se muestra) como en la grasa que rodea al corazón, así como menos acumulación de grasa en el hígado (**Figura 47a**). El análisis histológico de los tejidos reveló que había menos esteatosis en el hígado tanto en los animales tratados con Compuesto A 10mg/kg como tratados con GDC-0941 75mg/kg (**Figura 47b**). En este experimento no se observó “*browning*” en el tejido adiposo blanco ni fue evidente la mayor aparición de tejido adiposo marrón alrededor de los grandes vasos ni riñón como en el experimento anterior, posiblemente debido a que las dosis utilizadas fueron menores.



**Figura 47. Reducción de la grasa acumulada en los ratones tratados con Compuesto A 10mg/kg y GDC-0941 75mg/kg. a.** Imágenes representativas de hígados (arriba) y corazones (debajo) de un ratón tratado con vehículo, uno tratado con Compuesto A 10mg/kg, uno tratado con GDC-0941 10mg/kg y otro tratado con GDC-0941 75mg/kg. Las barras representan 0,5 cm **b.** Análisis histológico de los hígados de los ratones tratados con vehículo, Compuesto A 10mg/kg, GDC-0941 10mg/kg y con GDC-0941 75mg/kg. Las barras representan 500  $\mu$ m.



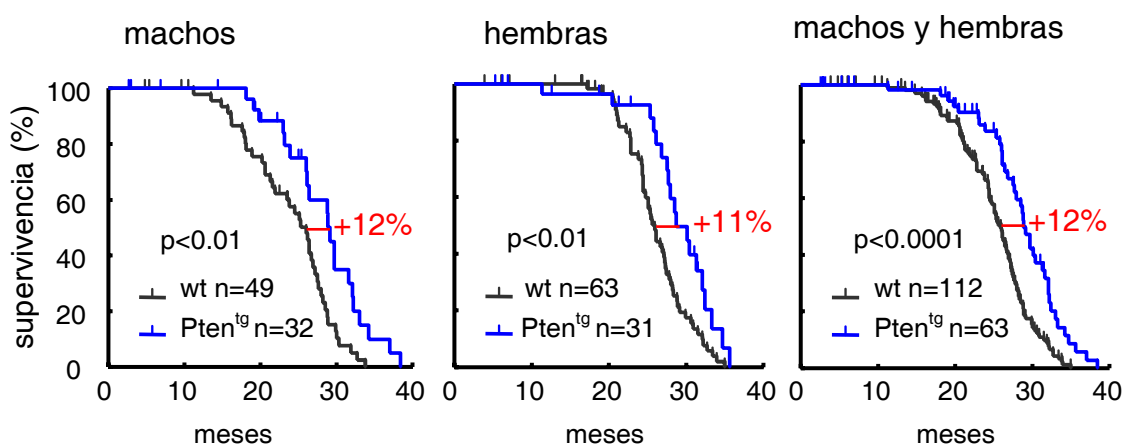
Aún queda por demostrar si estos compuestos aumentan el gasto energético en ratones obesos y el estudio de muchos parámetros metabólicos como la insulina o la leptina, hormonas muy implicadas en el desarrollo de la obesidad. Estos experimentos han sido una primera aproximación a la posible utilización de inhibidores de PI3K para la activación del tejido adiposo marrón ya que el tratamiento con ellos durante dos semanas, produce una reducción de la adiposidad sin pérdida del tejido magro y una protección frente al desarrollo de hígado graso derivado de la alimentación rica en grasa, por lo que podrían utilizarse como tratamiento contra la obesidad.

## 5. Estudio del efecto de Pten sobre el envejecimiento

Como se ha comentado ampliamente en la introducción, los ratones modificados genéticamente que tienen una actividad reducida de la vía de señalización de la insulina y de Igf1 presentan una mayor longevidad comparado con los ratones no modificados (Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010). Por ello nos preguntamos como estaría afectada la longevidad y el envejecimiento en los ratones que sobre-expresaban Pten.

### 5.1. Análisis del efecto de la sobre-expresión de Pten en la longevidad

Para estudiar el impacto de la sobre-expresión de Pten sobre la longevidad, seguimos a los ratones Pten<sup>tg</sup> y a sus correspondientes controles (*wild type*) a lo largo de su vida. Es muy importante destacar que, tanto hembras como machos Pten<sup>tg</sup> mostraron un aumento en su supervivencia, como indican las curvas *Kaplan-Meier* (Figura 48).



**Figura 48. Los ratones Pten<sup>tg</sup> presentan una mayor longevidad.** Curvas de supervivencia *Kaplan-Meier* en las que se representa la supervivencia de los machos (izquierda), la de las

hembras (centro) y la de los machos y hembras juntos (derecha). La significancia estadística que se muestra es la obtenida en el log-rank test. El número de ratones utilizados por genotipo y sexo se muestra en la figura. El porcentaje escrito en cada figura representa el aumento en la mediana de la supervivencia (edad a la están muertos el 50% de los ratones).

En la siguiente tabla (**Tabla 7**), se muestra el análisis estadístico detallado que se obtiene al representar las curvas de supervivencia, así como la mediana de la supervivencia, que en los machos está aumentada un 12% y en hembras un 11%.

| sexo    | comparación                           | test log-rank  |                   | tasa de riesgo relativo | IC 95% inferior-superior | mediana  |
|---------|---------------------------------------|----------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|--|
|         |                                       | X <sup>2</sup> | p                 |                         |                          |  |
| machos  | <i>wild type vs Pten<sup>tg</sup></i> | 7,051          | <b>0,0079</b>     | 2,220                   | 1,315-3,746              | <i>wild type</i> : 26,0<br><i>Pten<sup>tg</sup></i> : 29,1 |
| hembras | <i>wild type vs Pten<sup>tg</sup></i> | 8,788          | <b>0,003</b>      | 2,131                   | 1,209-3,172              | <i>wild type</i> : 25,9<br><i>Pten<sup>tg</sup></i> : 28,7 |
| m+h     | <i>wild type vs Pten<sup>tg</sup></i> | 16,71          | <b>&lt;0,0001</b> | 2,117                   | 1,455-2,952              | <i>wild type</i> : 25,9<br><i>Pten<sup>tg</sup></i> : 28,9 |

**Tabla 7. Datos estadísticos de las curvas de supervivencia Kaplan-Meier.**

También se estudió la supervivencia media de los ratones *Pten<sup>tg</sup>*; los machos viven de media 28,1 meses, las hembras 28,2 meses y 28,2 meses si tenemos en cuenta machos y hembras frente a los 23,8 meses de los machos *wild type*, 26,1 de las hembras *wild type* y frente a los 25,1 meses si juntamos machos y hembras (**Tabla 8**). Con estos datos concluimos que los ratones *Pten<sup>tg</sup>* tienen un aumento significativo en su supervivencia media. También se analizó la supervivencia máxima, otro parámetro de longevidad que da una idea de cuanto viven como máximo los ratones objeto de estudio. Dentro de la supervivencia máxima se estudian dos grupos: el 20% de los ratones más longevos (*oldest 20%*) y el 10% de los ratones más longevos (*oldest 10%*). De estos dos grupos también se estudia su supervivencia media y se observó que tanto el grupo de ratones *Pten<sup>tg</sup>* 10% más longevos como el 20% más longevos presentaron una supervivencia mayor, tanto en machos como en conjunto machos y hembras. (**Tabla 8**)

| sexo    | genotipo                  | n  | rango <sup>a</sup> | supervivencia media $\pm$ s.d.  |                                      |                                      |
|---------|---------------------------|----|--------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|         |                           |    |                    | todos<br>(p-valor) <sup>b</sup> | oldest 20%<br>(p-valor) <sup>b</sup> | oldest 10%<br>(p-valor) <sup>b</sup> |
| machos  | <i>wild type</i>          | 42 | 11,2-33,8          | 23,8 $\pm$ 5,6                  | 30,8 $\pm$ 1,8                       | 32,2 $\pm$ 1,5                       |
|         | <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 21 | 18,1-38,4          | 28,1 $\pm$ 5,6<br>(0,005)       | 35,7 $\pm$ 2,5<br>(0,003)            | 37,7 $\pm$ 1,0<br>(0,010)            |
| hembras | <i>wild type</i>          | 52 | 17,2-35,0          | 26,1 $\pm$ 4,0                  | 31,9 $\pm$ 1,8                       | 33,2 $\pm$ 1,1                       |
|         | <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 19 | 11,3-35,6          | 28,2 $\pm$ 5,5<br>(0,08)        | 34,0 $\pm$ 1,4<br>(0,05)             | 35,1 $\pm$ 0,7<br>(0,07)             |
| m+h     | <i>wild type</i>          | 94 | 11,2-35,0          | 25,1 $\pm$ 4,9                  | 31,1 $\pm$ 1,9                       | 32,5 $\pm$ 1,3                       |
|         | <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 40 | 11,3-38,4          | 28,2 $\pm$ 5,5<br>(0,002)       | 34,8 $\pm$ 2,1<br>( $<0,0001$ )      | 36,4 $\pm$ 1,7<br>(0,0002)           |

**Tabla 8. Datos de supervivencia media y máxima de los ratones *Pten*<sup>tg</sup>.** <sup>a</sup>Las edades vienen dadas en meses. Oldest 20% y 10% se refiere al 20% o al 10% de ratones más longevos. <sup>b</sup>El test estadístico utilizado es la prueba t de Student.

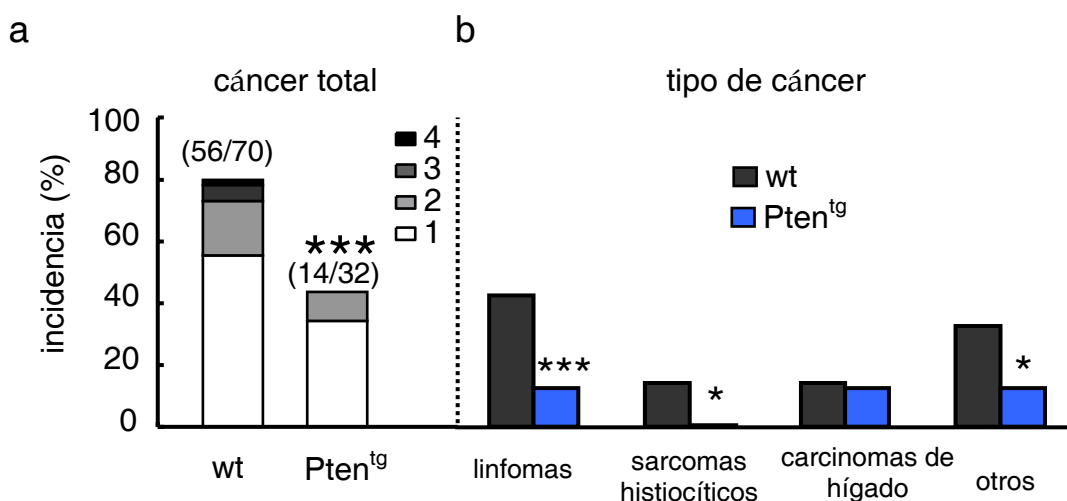
Hicimos otros estudios estadísticos como la regresión de COX para demostrar que este aumento de longevidad sólo se debe al genotipo y no a otras variables como la identidad de los padres, la fecha de nacimiento, o el tamaño del grupo experimental (Tabla 9).

| covariable  | B      | ET    | Wald   | gl | sig.     | exp(B) | 95% IC<br>inferior- superior |       |
|-------------|--------|-------|--------|----|----------|--------|------------------------------|-------|
| SEX         | -0,114 | 0,175 | 0,419  | 1  | 0,517    | 0,893  | 0,633                        | 1,259 |
| GEN         | -0,787 | 0,200 | 15,480 | 1  | $<10e-3$ | 0,455  | 0,308                        | 0,674 |
| DOB         | 0,012  | 0,007 | 3,016  | 1  | 0,082    | 1,012  | 0,998                        | 1,026 |
| MOM         | -0,004 | 0,009 | 0,158  | 1  | 0,691    | 0,996  | 0,978                        | 1,015 |
| DAD         | 0,025  | 0,018 | 1,877  | 1  | 0,171    | 1,026  | 0,989                        | 1,063 |
| Parental_ID | 0,020  | 0,012 | 2,665  | 1  | 0,103    | 1,020  | 0,996                        | 1,045 |

**Tabla 9. Regresión de COX para las dos poblaciones.** DOB: fecha de nacimiento del ratón; GEN: genotipo; MOM: madre; DAD: padre; parental ID: pareja madre/padre. B: coeficiente de regresión de COX y su error estándar (ET); Wald: valor estadístico del test Wald; gl: grados de libertad; Sig: significancia; exp(B): riesgo relativo; y su intervalo de confianza 95%

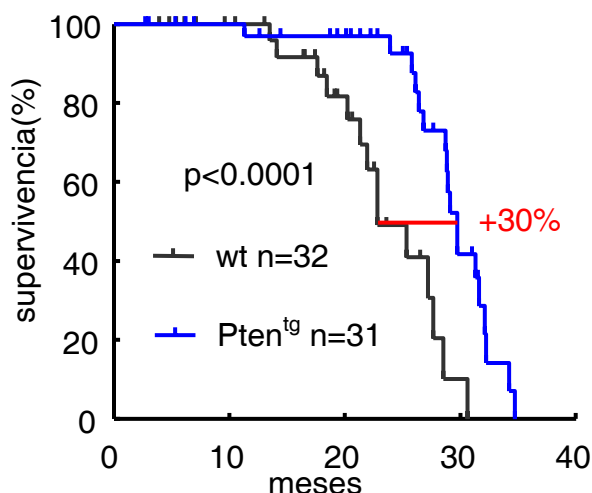
## 5.2. Análisis del efecto de la sobre-expresión de Pten sobre el desarrollo espontáneo de tumores

Tras la muerte de los ratones se hizo un análisis histológico de las patologías con la ayuda de la Dra. Marta Cañamero y se evaluó la presencia de cáncer en ambos grupos experimentales. Se observó que los ratones  $Pten^{tg}$  presentaban menos incidencia de cáncer (se contabilizaron sólo neoplasias malignas y no pre-malignas) así como menos tumores por ratón en el caso de desarrollar cáncer (**Figura 49a**). Este resultado va en concordancia con el papel como supresor tumoral de Pten. Además se observó un menor desarrollo de linfomas y sarcomas histiocíticos aunque no se vio reducida la formación de tumores de hígado (**Figura 49b**). En relación a esto último, se ha demostrado que la falta de Pten está implicada en el desarrollo de múltiples tumores incluyendo linfomas pero no en tumores de hígado (Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 2000).



**Figura 49. Los ratones  $Pten^{tg}$  desarrollan menos cáncer espontáneo.** **a.** Incidencia de cáncer en los ratones  $Pten^{tg}$ . También se representa el porcentaje de ratones que tenían 1, 2, 3 o 4 tumores. **b.** Porcentaje de ratones que padecían los tumores mencionados. La significancia estadística fue determinada utilizando el test de Fisher. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Así pues, nos preguntamos, si el efecto en el retraso del envejecimiento fue consecuencia de que los ratones  $Pten^{tg}$  tuvieran menos cáncer. Por ello, representamos la supervivencia de los ratones en curvas *Kaplan-Meier* excluyendo a los ratones de ambos grupos que murieron con cáncer. Vimos que en este caso, los ratones  $Pten^{tg}$  también viven más, cuando se comparan con ratones wt que mueren libres de cáncer (**Figura 50**).



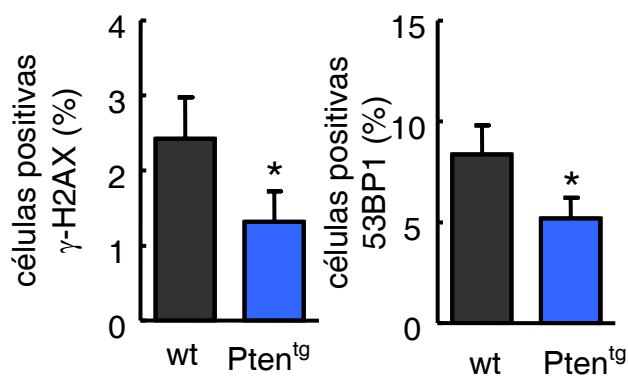
**Figura 50.** Los ratones  $Pten^{tg}$  que no desarrollaron cáncer son más longevos. Curvas de supervivencia *Kaplan-Meier* en las que se representa la supervivencia de machos y hembras de los ratones *wild type* y  $Pten^{tg}$ . La significancia estadística se calculó por el log-rank test.

Por tanto vemos que la sobre-expresión de *Pten* tiene un impacto directo en la longevidad independiente de su papel como supresor de tumores. Para investigar esto en detalle, analizamos algunos marcadores asociados al proceso de envejecimiento.

### 5.3. Análisis del efecto de la sobre-expresión de *Pten* sobre marcadores asociados al proceso de envejecimiento

#### 5.3.1. Acumulación de daño en el ADN

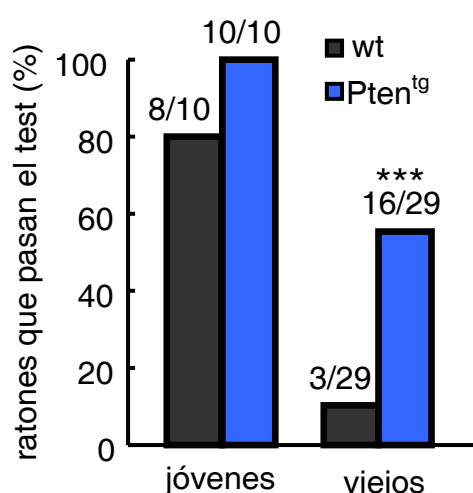
La acumulación de daño en el ADN en los tejidos (y sobre todo en el hígado) durante el envejecimiento, es uno de los marcadores moleculares más usados (Matheu et al., 2007; Wang et al., 2009). Utilizando hígados de ratones viejos (1,5-2 años) se hicieron inmunofluorescencias de 2 marcadores de daño al ADN,  $\gamma$ H2AX y 53BP1 y se vio que en el hígado de los ratones  $Pten^{tg}$  había menos daño en el ADN comparado con hígados de ratones *wild type* (Figura 51).



**Figura 51.** Los hígados de los ratones  $Pten^{tg}$  viejos presentan menos daño en el ADN. Porcentaje de células positivas para el marcador de daño  $\gamma$ H2Ax (izquierda) y para el marcador 53BP1 (derecha). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0.05$ .  $n=4$  machos de 1,5-2 años por genotipo.

### 5.3.2. Coordinación neuromuscular

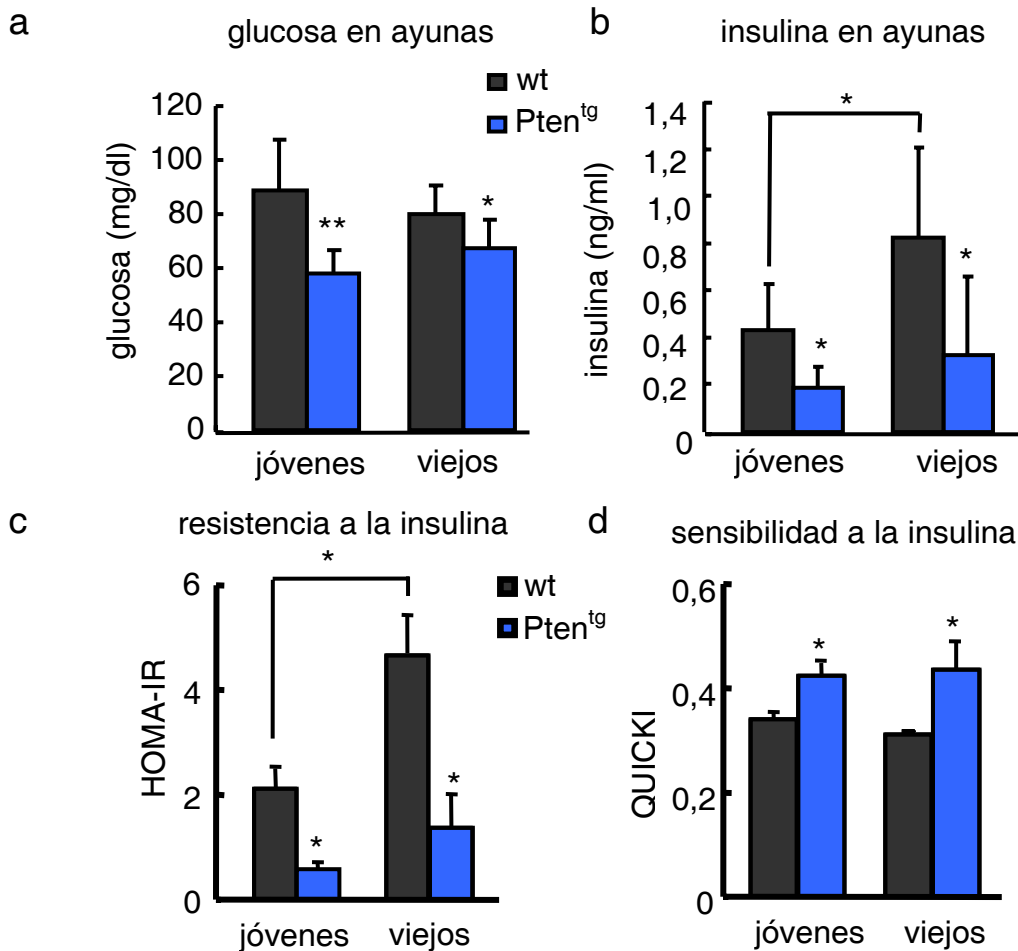
Un factor que disminuye con la edad es la coordinación neuromuscular (Ingram and Reynolds, 1986). Para analizar la coordinación neuromuscular, se utilizó un ensayo llamado “*tightrope*” en el que se estudia la capacidad de un ratón de permanecer sobre una barra de sección cilíndrica (60 cm de largo y 1,5 cm de diámetro) más de un minuto. Se considera el test satisfactorio si el ratón está más de un minuto sobre la barra en al menos uno de un total de 5 intentos consecutivos. Los ratones *Pten*<sup>tg</sup> viejos superaron mejor este test (**Figura 52**) por lo que concluimos que tienen mejor coordinación neuromuscular que los ratones *wild type*.



**Figura 52. Los ratones *Pten*<sup>tg</sup> viejos presentan mejor coordinación neuromuscular.** Porcentaje de ratones que pasaron con éxito el test “*tightrope*”. Los ratones fueron colocados en una barra de sección circular de 1,5 cm de diámetro y 60 cm de largo. Se considera que un ratón supera el test cuando es capaz de mantenerse encima de la barra durante al menos 1 minuto en al menos un intento de cinco consecutivos. Se utilizaron ratones jóvenes de menos de 6 meses (n=10 por genotipo) y ratones viejos de 1,5-2 años (n=29 por genotipo). La significancia estadística fue determinada utilizando el test de Fisher. \*\*\*p<0,001.

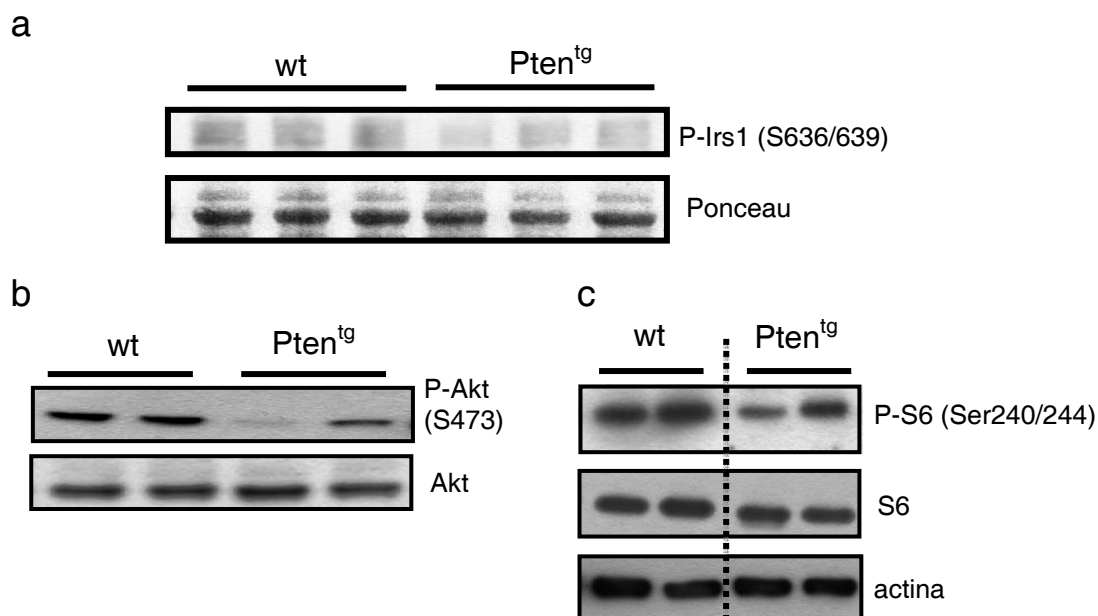
### 5.3.3. Sensibilidad a la insulina

Durante el proceso de envejecimiento se va adquiriendo resistencia a la insulina. Se ha demostrado que una característica común de los ratones longevos que tienen la actividad de la ruta de señalización de insulina o Igf1 disminuida, es su mejor sensibilidad a la insulina debido a una menor activación de los ciclos de retroalimentación negativos (*negative feedback loops*) que controlan esta ruta de señalización (Bartke, 2008). Por ello, nosotros analizamos los niveles de glucosa e insulina de machos jóvenes y viejos. Se vio que los ratones *Pten*<sup>tg</sup> tienen menores niveles de insulina y glucosa tras 16 horas de ayuno (**Figura 53a y b**), lo que resulta en mejores índices HOMA-IR (*homeostatic model assessment-insulin resistance*) y QUICKI (*Quantitative insulin sensitivity check index*) (**Figura 53c**). Estos dos índices se han usado ampliamente en la literatura para referirse a la resistencia a la insulina en numerosos modelos murinos (Lee et al., 2008; Selman et al., 2009; Yamaza et al., 2010).



**Figura 53. Los ratones Pten<sup>tg</sup> viejos presentan mejor sensibilidad a la insulina.** **a.** Niveles de glucosa en condiciones de ayuno durante 16h en ratones jóvenes y viejos. **b.** Niveles de insulina en condiciones de ayuno durante 16h en ratones jóvenes y viejos. **c.** Resistencia a la insulina medida utilizando el índice HOMA-IR a partir de los niveles de glucosa e insulina en ayuno 16h. **d.** Sensibilidad a la insulina medida utilizando el índice QUICKI a partir de los niveles de glucosa e insulina en ayuno 16h. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0.01$ .  $n = 5-7$  machos por genotipo y grupo de edad; la edad de los machos jóvenes corresponde a menos de 6 meses, la edad de los machos viejos corresponde a 1,5-2 años.

También examinamos las fosforilaciones inhibitorias de Irs1 en los residuos Ser636 y Ser639 en el tejido adiposo blanco de ratones viejos Pten<sup>tg</sup>. Los ratones viejos Pten<sup>tg</sup> presentaban menor fosforilación de la Ser473 de Akt además y presentaban menores niveles de fosforilación de Ser636/639 de Irs1 comparado con la grasa de los ratones viejos *wild type* (Figura 54a y b). Esta menor fosforilación, podría reflejar disminución del ciclo de retroalimentación negativa regulado por S6K y en concordancia con esto, encontramos menor actividad quinasa de S6K, que se refleja en menor fosforilación de su sustrato S6 en la grasa de los ratones Pten<sup>tg</sup> comparado con los ratones *wild type*. (Figura 54c).

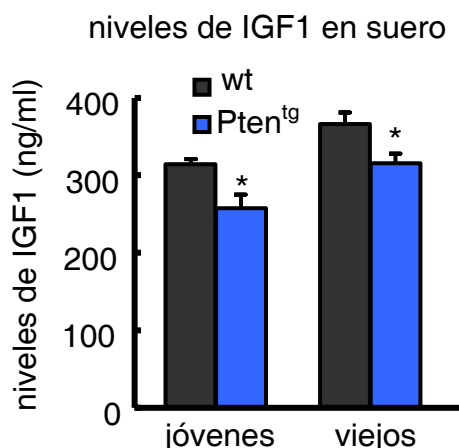


**Figura 54. Los ratones *Pten*<sup>tg</sup> viejos presentan menor fosforilación de Irs1. a, b.** Inmunodetección de las proteínas indicadas en extractos proteicos de tejido adiposo blanco de machos viejos (1,5-2 años de edad). **c.** Inmunodetección de las proteínas indicadas en extractos proteicos de tejido adiposo blanco de machos jóvenes de menos de 6 meses de edad.

Estos datos apoyan el concepto de que una mejor sensibilidad a la insulina en los ratones *Pten*<sup>tg</sup> se debe a un menor nivel de actividad basal de los mecanismos de retroalimentación negativos. Esto lo hemos ilustrado con la observación de que en estos ratones, a edades avanzadas, hay menor fosforilación y por tanto menos inhibición Irs1 por mTORC1/S6K lo que se traduce en una mejor sensibilidad a la insulina.

Acorde con las publicaciones anteriores que demuestran que distintos modelos animales más longevos tienen una reducción de la concentración de IGF1 en sangre (Bartke, 2008; Brown-Borg et al., 1996; Coschigano et al., 2000; Flurkey et al., 2001); estuvimos interesados en determinar los niveles de IGF1 en sangre tanto en ratones jóvenes como en viejos, viendo que tanto en animales *Pten*<sup>tg</sup> jóvenes como en *Pten*<sup>tg</sup> viejos los niveles de esta hormona se ven reducidos en suero (**Figura 55**).

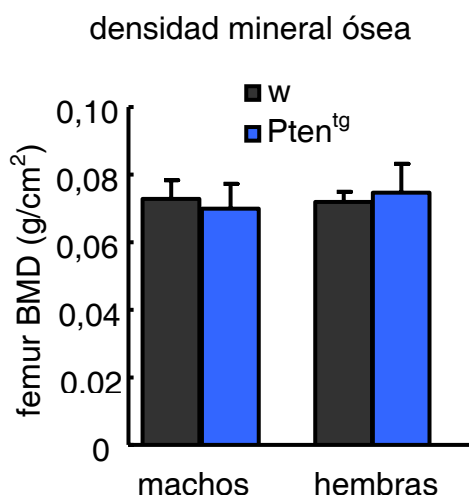




**Figura 55. Los ratones Pten<sup>tg</sup> presentan menos IGF1 en suero.** Niveles de IGF1 medidos en suero de ratones jóvenes (<6 meses de edad) y viejos (1,5-2 años de edad). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student. \* $p < 0,05$ .  $n = 4$  machos por grupo.

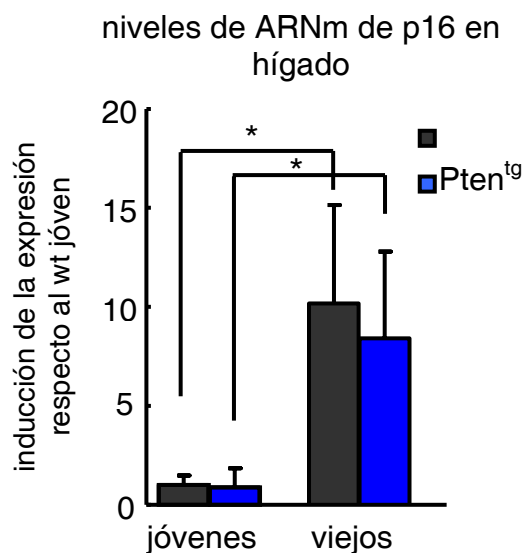
#### 5.3.4. Otros marcadores de envejecimiento

Otros marcadores de envejecimiento fueron analizados como la densidad mineral ósea (Figura 56) aunque no encontramos diferencias significativas entre los machos y hembras Pten<sup>tg</sup> viejos y los wt viejos



**Figura 56. Los ratones Pten<sup>tg</sup> viejos no tienen más densidad mineral ósea.** Valores de densidad mineral ósea medida por densitometría de fémur de animales de 1,5-2 años de edad. Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student sin diferencias significativas  $p > 0,05$ .  $n = 6$  por genotipo y grupo

A nivel molecular, estudiamos los niveles de p16<sup>INK4a</sup>, ya que previamente se ha publicado que los niveles de ARN mensajero de este gen aumentan durante el envejecimiento (Krishnamurthy et al., 2004). Por tanto, se analizaron los niveles de ARNm de p16<sup>INK4a</sup> en hígados de machos jóvenes y viejos de ratones *wild type* y Pten<sup>tg</sup>. Si bien se observa un aumento de expresión de p16 entre ratones jóvenes y viejos que concuerda con lo anteriormente publicado, no se observaron diferencias significativas entre los ratones viejos de ambos genotipos (Figura 57), posiblemente debido a la gran variabilidad en los resultados obtenidos por lo que será necesario aumentar el número de ratones analizados.



**Figura 57. Niveles de ARNm de p16<sup>INK4a</sup> en el hígado.** RT-PCR de los niveles de ARNm en el hígado de ratones jóvenes (n=3) y de ratones viejos (n=4). Las barras representan la media  $\pm$  desviación típica (dt). La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student sin diferencias significativas  $p > 0,05$  al comparar genotipos;  $*p < 0,05$  al comparar jóvenes y viejos.

Después de estudiar la supervivencia y un gran número de factores que influyen en el envejecimiento podemos concluir que una moderada y regulada sobre-expresión de Pten resulta en un aumento de la longevidad y en un retraso en muchos de los marcadores de envejecimiento analizados como acumulación del daño en el ADN, coordinación neuromuscular y sensibilidad a la insulina.



## DISCUSIÓN



En esta memoria hemos presentado la generación de un nuevo modelo de ratón que tiene una sobre-expresión moderada y constitutiva del supresor de tumores Pten. Con este modelo animal hemos pretendido profundizar en el papel de PTEN en aspectos tan importantes como metabolismo y envejecimiento, sin olvidar su papel como supresor tumoral.

## **1. PTEN y metabolismo**

Hemos generado ratones que expresan bajo sus propios elementos reguladores unas dos veces más del supresor de tumores Pten. El fenotipo observable más inmediato fue su bajo peso y su menor adiposidad. Este menor peso corporal, se corresponde con otros modelos animales con la ruta de señalización de AKT disminuida como el modelo animal que posee una sola copia de Akt1 y es deficiente en las 2 isoformas de Akt existentes (Akt2 y Akt3) (Dummler et al., 2006). Otros modelos animales como el S6K1-nulo (Um et al., 2004) también presenta un tamaño corporal disminuido.

Además los ratones Pten<sup>tg</sup> son hiperfágicos lo que nos llevó a pensar que tendrían un gasto energético aumentado, que se comprobó posteriormente. Este gasto energético aumentado se debe a una mayor actividad en el tejido adiposo marrón. Junto con el tejido adiposo marrón, el músculo es otro órgano importante responsable del gasto energético. En particular, sobre-expresión de Pgc1 $\alpha$  (Lin et al., 2002a) o compuestos que activan a Pgc1 $\alpha$  a través de SIRT1 (SRT1720) (Feige et al., 2008) inducen el cambio de las fibras musculares tipo II (con baja capacidad oxidativa) en fibras tipo I (con alta capacidad oxidativa) y en algunos casos se ha asociado a un aumento en el gasto energético. En nuestro caso, no detectamos este cambio de fibras tras el examen de la actividad succinato deshidrogenasa en el músculo gastrocnemio, por lo que esto refuerza la idea que el aumento del gasto energético en los ratones Pten<sup>tg</sup> se debe a una mayor actividad de los adipocitos marrones.

EL mayor gasto energético se ha relacionado con una menor acumulación de grasa y una protección frente al daño metabólico. Los ratones Pten<sup>tg</sup> presentan una menor acumulación de grasa blanca y además están protegidos frente al desarrollo del hígado graso inducido por una dieta rica en grasa. Los ratones carentes de S6K1, uno de los mediadores de la ruta de señalización de PI3K/ AKT también están protegidos de este daño metabólico debido a que S6K1 media una regulación negativa de la ruta de

señalización de PI3K. Tras una exposición continuada a nutrientes e insulina (como en el caso de la dieta rica en grasas), esta ruta de señalización se desensibiliza por la fosforilación de IRS1 mediada por mTORC1 y S6K que fosforilan a IRS1 y promueven su degradación. Esto hace que la ruta de señalización de la insulina no funcione y los tejidos se vuelvan resistentes a su acción, desarrollando hiperinsulinemia. Por el contrario, en los ratones S6K1-nulos, este lazo de retroalimentación negativa está reducido, aumentando su sensibilidad a la insulina en condiciones de obesidad. Los ratones Pten<sup>tg</sup> tras una exposición de 6 meses a HFD (dieta rica en grasa) presentan menos acumulación de lípidos en el hígado y tras el ensayo de tolerancia a la insulina se ha visto que son más sensibles. Sin embargo, en condiciones de alimentación estándar y en ratones jóvenes los experimentos de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina no han arrojado resultados claros aunque se esperaba que como en otros modelos animales con la ruta de señalización de PI3K/AKT disminuida fueran más resistentes a la insulina y a la glucosa.

Así mismo se observó que la sobre-expresión de Pten en el tejido adiposo marrón conducía a una hiperactivación del mismo lo que condujo a que nos planteáramos la utilización de inhibidores de PI3K como posibles activadores del tejido adiposo marrón y su posible utilización en tratamientos contra la obesidad.

### 1.1. PTEN y tejido adiposo marrón

El mecanismo más eficiente que se conoce para disipar energía de manera inducible es a través del tejido adiposo marrón (Cannon and Nedergaard, 2004). El tejido adiposo marrón poco a poco está adquiriendo mayor importancia gracias a que se ha descubierto que está activo en el humano adulto (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Hemos visto que el tejido adiposo marrón de los Pten<sup>tg</sup> es más activo lo que concuerda con su elevado gasto energético. Además en este tejido, hay mayores niveles de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$ . Ucp1 media la disipación de la energía en los adipocitos marrones (Kozak and Anunciado-Koza, 2008) y en consecuencia los niveles de ARNm de Ucp1 en el tejido adiposo marrón de los ratones Pten<sup>tg</sup> están aumentados. Además de este aumento, también se ha observado un aumento en los niveles de su principal regulador transcripcional que es Pgc1 $\alpha$ . Así mismo, Pgc1 $\alpha$  está implicado en la regulación de otros procesos metabólicos como la

oxidación de los ácidos grasos (Puigserver and Spiegelman, 2003; Puigserver et al., 1998; Vega et al., 2000). En consecuencia algunos genes que están implicados en dicho proceso están aumentados en el BAT de los ratones Pten<sup>tg</sup>. En el tejido adiposo blanco de estos ratones también se ha podido detectar expresión de Ucp1, cuya expresión está limitada sólo al tejido adiposo marrón lo que sugiere que los ratones Pten<sup>tg</sup> tienen un mayor número de adipocitos marrones dispersados en el tejido adiposo blanco. Esta localización de adipocitos marrones en el tejido blanco contribuye a la termogénesis y al gasto energético sistémico. En otros modelos animales como el ratón transgénico de PRDM16 en grasa blanca (factor de transcripción imprescindible para la diferenciación del tejido adiposo marrón) presenta tras la estimulación con CL316243 (un agonista de la ruta de señalización  $\beta_3$ -adrenérgica), un aumento de la población de adipocitos marrones en su tejido adiposo blanco (Seale et al., 2007). También se ha estudiado que la sobre-expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2), enzima implicada en la síntesis de prostaglandinas, muestran mayor acumulación de estos adipocitos marrones y proponen que las prostaglandinas producidas en las células del tejido adiposo blanco (en respuesta a la señalización  $\beta_3$ -adrenérgica) o procedentes de la circulación pueden estimular la formación de estos adipocitos marrones (llamados también células *beige*) (Vegiopoulos et al., 2010). Estudios futuros deberán aclarar cuál es el papel de Pten en el aumento de estas células en el tejido adiposo blanco.

En el hígado, se ha demostrado que el factor de transcripción Foxo1 es crítico para la función que ejerce Pgc1 $\alpha$  (Matsumoto et al., 2007; Puigserver et al., 2003). Además Akt fosforila e inhibe a Pgc1 $\alpha$  (Li et al., 2007) y a Foxo1 (Kops et al., 1999). Así mismo, Foxo1 junto con Pgc1 $\alpha$  regulan positivamente la transcripción de este último. Basados en estas observaciones, analizamos los niveles de fosforilación de Akt en el tejido adiposo marrón de los ratones Pten<sup>tg</sup> y vimos que son menores; lo que se corresponde con una menor actividad de Akt y por tanto una menor fosforilación de Foxo1 (**Figura 32**). Así, una mayor actividad transcripcional de Foxo1 estaría aumentando los niveles de Pgc1 $\alpha$  y por tanto de Ucp1. Para demostrar que el aumento de Pten induce la expresión de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$ , vía inhibición de la ruta de señalización de Akt, utilizamos un inhibidor específico de PI3K en 2 tipos celulares distintos de adipocitos marrones y vimos que el tratamiento con el inhibidor de PI3K sólo o tras la estimulación  $\beta_3$ -adrenérgica por el uso de forskolina, aumenta los niveles de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$ . Por tanto demostramos que el aumento de transcripción de Ucp1 es intrínseco (*cell-autonomous*) a los adipocitos



marrones  $Pten^{tg}$ . Basados en estos resultados, nos preguntamos ahora, si Foxo1 regula la transcripción de  $Pgc1\alpha$  (igual que en músculo e hígado) y  $Ucp1$  directamente; por tanto se están realizando los experimentos necesarios para determinar este nuevo mecanismo de regulación transcripcional.

También se ha propuesto que  $Pten$  aumenta la eficiencia de la generación de tejido adiposo marrón ectópico tras la implantación de fibroblastos wt y  $Pten^{tg}$  que expresaban los factores de transcripción  $Prdm16$  y  $Cebp\beta$  necesarios para la formación de estos depósitos de tejido marrón (Kajimura et al., 2009).

## 1.2. Inhibidores de PI3K como tratamiento anti-obesidad

Los avances recientes en el estudio de la biología y fisiología del tejido adiposo marrón hacen suponer que este tejido tiene un importante papel en el control de la homeostasis energética y por lo tanto sugiere nuevas estrategias para combatir la obesidad y sus patologías asociadas tanto en ratones como humanos. Numerosos estudios en modelos animales han demostrado que el aumento de actividad del tejido adiposo marrón puede contrarrestar el desarrollo de la obesidad a través del aumento del gasto energético (como el transgénico de  $Ucp1$  específico de grasa; (Kopecky et al., 1995)). Sin embargo surgen muchas preguntas como, ¿cuánto tejido adiposo marrón hace falta para aumentar el gasto energético y poder contrarrestar el desarrollo de la obesidad? Una posible solución sería el trasplante de adipocitos marrones diferenciados a partir de fibroblastos. La primera aproximación fue realizada por el laboratorio del Dr. B. Spiegelman en 2009, en el que se transplantaron tejido adiposo marrón ectópico generado a partir de fibroblastos que expresaban dos factores,  $PRDM16$  y  $C/EBP\beta$  (Kajimura et al., 2009). Es muy importante también aclarar, a través de sus reguladores transcripcionales como  $FOXC2$ ,  $pRb$ ,  $RIP140$ ,  $PRDM16$  y  $PGC1\alpha$  (Cederberg et al., 2001; Christian et al., 2005; Hansen et al., 2004; Leonardsson et al., 2004; Puigserver et al., 1998; Scime et al., 2005; Seale, 2007; Seale et al., 2007) , si hay una o varias rutas de señalización y mecanismos que inducen el desarrollo del tejido adiposo marrón. Sin embargo la transferencia de genes o la implantación de células no son métodos óptimos para el tratamiento de la obesidad en humanos, por lo que se tienen que explorar alternativas que potencien el desarrollo del tejido adiposo marrón y su actividad (**Figura 58**). También queda por aclarar el origen de los adipocitos marrones

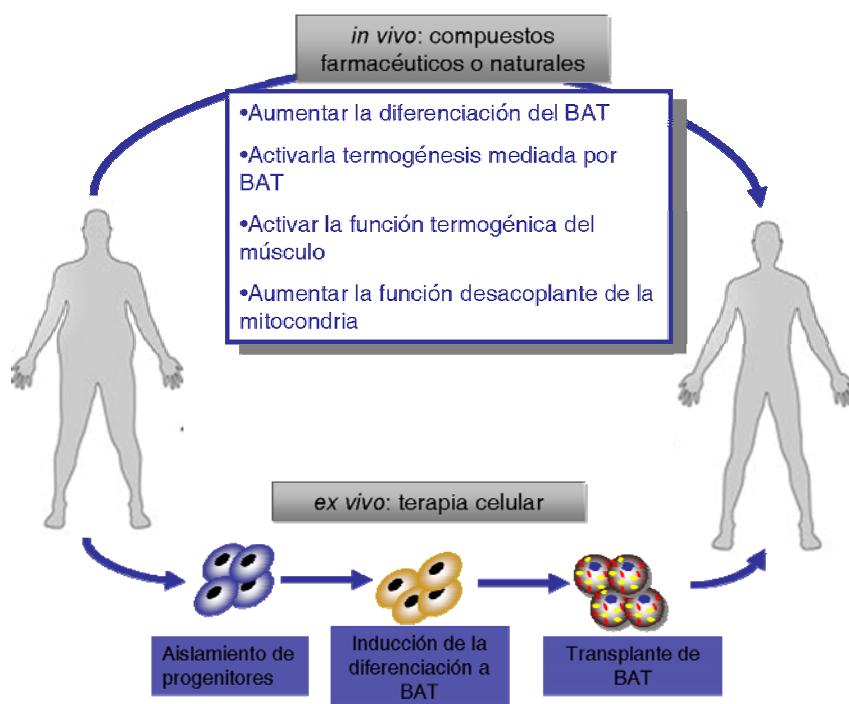
que se encuentran repartidos por el tejido adiposo blanco cuya inducción es dependiente de AMPc a partir de un linaje independiente del factor *Myf5*, y están asociados a la protección frente a la obesidad y las enfermedades metabólicas (Cederberg et al., 2001; Ishibashi and Seale, 2010; Leonardsson et al., 2004). Una mejor comprensión de los circuitos moleculares que regulan el desarrollo del tejido adiposo marrón y su desarrollo puede dar lugar al desarrollo de drogas específicas que actúen sobre el desarrollo de la obesidad (**Figura 58**).

En la búsqueda de tratamientos contra esta enfermedad también se ha puesto mucho énfasis en encontrar drogas que activen la termogénesis mediada por el tejido adiposo marrón aunque la activación del BAT mediante la utilización de agonistas de la señalización  $\beta_3$ -adrenérgica no han tenido el éxito esperado en humanos (Clapham and Arch, 2007). La leptina disminuye el apetito, aumenta el gasto energético y es capaz de revertir la obesidad en los ratones *ob/ob* (Zhang et al., 1994). Sin embargo, la deficiencia de leptina es rara en humanos y la mayoría de los obesos son resistentes a la leptina, por lo que la administración de leptina sólo sería efectiva en un reducido número de pacientes (Friedman, 2009) (**Figura 58**).

La tercera aproximación sería aumentar la función termogénica del músculo esquelético (**Figura 58**). Dado los beneficios que aporta el ejercicio físico, se hace muy atractivo descubrir tratamientos (Himms-Hagen, 2004) que aporten los mismos beneficios especialmente para aquellos individuos con limitaciones físicas o aquellos predispuestos a desarrollar obesidad (Goodyear, 2008). En este sentido se han estudiado compuestos activadores de SIRT1 como el resveratrol que aumenta que protege a los ratones frente a la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina (Lagouge et al., 2006) o su análogo SRT1720 que además de la función que ejerce sobre el músculo se ha visto que tiene una función directa en el BAT al modificar el tamaño de sus gotas lipídicas y su patrón de expresión de genes (Feige et al., 2008). Otra enzima implicada en la bioenergética celular es AMPK (*AMP-activated protein kinase*), que detecta el estado nutricional de la célula y ayuda a regular el transporte de glucosa, la oxidación de los ácidos grasos y adaptaciones metabólicas del músculo esquelético. La activación continua de AMPK por AICAR (*5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside*) aumenta la función mitocondrial del músculo

esquelético (Koh et al., 2008). Ya hay ensayos clínicos utilizando resveratrol o AICAR para el tratamiento de enfermedades metabólicas.

Por último otra aproximación sería aumentar la función desacoplante en la mitocondria (*mitochondrial uncoupling*) lo que permitiría aumentar el gasto energético. En esta línea se ha estudiado el compuesto 2,4-dinitrofenol (DNP) pero puede generar efectos adversos relacionados con una utilización en exceso (Colman, 2007) (Figura 58).



**Figura 58 Aproximaciones terapéuticas para combatir la obesidad aumentando el gasto energético.** Basadas en el conocimiento actual se pueden establecer cuatro aproximaciones terapéuticas: el aumento de la diferenciación del BAT, activación de la termogénesis mediada por el BAT o por el músculo y aumentar la función desacoplante de la mitocondria. También se podría utilizar la terapia celular como alternativa, diferenciando células del paciente obeso a adipocitos marrones para transplantárselos posteriormente, lo que ayudaría a disipar el exceso de energía.

Por tanto basados en el conocimiento actual se han propuesto cuatro aproximaciones terapéuticas para activar el tejido adiposo marrón y aumentar el gasto energético en un esfuerzo de reducir la obesidad.

En esta línea, en la presente tesis doctoral hemos querido acercarnos a la investigación de nuevos compuestos que sirvan como tratamiento frente a la obesidad. Debido a los resultados obtenidos en nuestro modelo *Pten<sup>tg</sup>* el cual presentaba un tejido adiposo más activo y un mayor gasto energético, creímos oportuno probar los inhibidores de

PI3K como posible tratamiento para inducir la actividad tejido marrón y por lo tanto la reducción de la obesidad. Previamente, nuestros estudios *in vitro* con células 3T3L1-Cebp $\beta$ , con pre-adipocitos marrones y con adipocitos marrones diferenciados han demostrado que el tratamiento con inhibidores de PI3K aumentan la transcripción de Pgc1 $\alpha$  y Ucp1, principales mediadores de la actividad del tejido adiposo marrón; además hemos visto que la sobre-expresión de Pten en fibroblastos murinos y posterior infección con los factores de transcripción Prdm16 y Cebp $\beta$  hace que se formen depósitos de tejido graso marrón de forma más eficiente que con la implantación de fibroblastos sin sobre-expresión de Pten. Además se ha demostrado que el tratamiento de ratones obesos con estos inhibidores lleva a una reducción de peso y una reducción en la adiposidad sin reducir el peso del tejido magro y sin provocar toxicidad aunque son necesarios estudios que aclaren si estos inhibidores son capaces de aumentar también el gasto energético. Además estos compuestos no afectan al peso corporal de los ratones alimentados con dieta estándar. Todos estos datos, junto con los resultados preliminares obtenidos de los dos ensayos realizados en ratones obesos, apuntan que el uso de los inhibidores de PI3K pueden ser una buena aproximación para contrarrestar la obesidad y sus enfermedades asociadas.

## 2. PTEN y envejecimiento

Nuestro laboratorio, durante estos últimos años, ha investigado para establecer una relación entre los genes supresores de tumores y longevidad. A partir de los modelos animales con una dosis extra de los supresores tumorales más importantes como p53, p16<sup>INK4a</sup>, y ARF se ha establecido una importante relación entre cáncer y envejecimiento. El incremento de la dosis de estos tres genes tienen un efecto cooperativo en la protección contra el desarrollo de cáncer en los ratones p53<sup>tg</sup>/(p16/ARF)<sup>tg</sup> y además son un 16% más longevos. Además el aumento en la longevidad se debe a un retraso en el envejecimiento de estos ratones y no a la protección en el desarrollo de cáncer que les confiere el tener copias extra de estos genes supresores de tumores (Matheu et al., 2009; Matheu et al., 2007; Matheu et al., 2008). Este aumento de longevidad se debe al papel protector de p53 y ARF frente al daño celular que se acumula durante el envejecimiento.

Cabe destacar, que la ruta de PI3K/AKT/mTOR/S6K también ha sido relacionada en los últimos años con el envejecimiento (ver **Figura 4**). Numerosos estudios en otros modelos animales como levaduras (*S. cerevisiae*), nematodos (*C. elegans*), moscas (*D. melanogaster*) e incluso en ratón, han revelado que una disminución en la señalización de esta ruta, retrasa el envejecimiento en estos organismos. Concretamente se ha visto en *S. cerevisiae* que la delección de TOR1 o SCH9 (homólogo de Akt y S6K en ratón) conlleva a un aumento de la longevidad (Burtner et al., 2009; Fabrizio et al., 2001). En *C. elegans*, se ha visto que este aumento de longevidad requiere al factor de transcripción daf-16 (homólogo de FOXO en mamíferos), el cual regula la expresión de genes implicados en respuesta celular frente al estrés, actividad antimicrobiana y detoxificación. Además la disminución de la ruta de TOR y S6K pueden aumentar la longevidad de estos nematodos. (Hansen et al., 2008; Johnson, 2008; Libina et al., 2003). Se ha visto además que el homólogo de PTEN en nematodo, daf-18 juega un papel muy importante en longevidad (Mihaylova et al., 1999). Por su parte en *D. melanogaster* también se ha estudiado que una disminución de la ruta de señalización IIS (*Insulin/IGF1 signaling pathway*) tiene un papel clave en envejecimiento (Piper et al., 2008), aunque cabe por determinar si FOXO tiene un papel importante (Fontana et al., 2010). Además la disminución de la señalización de TOR, ya sea por manipulación genética (Kapahi et al., 2004) o por tratamiento con su inhibidor rapamicina (Bjedov et al., 2010) tiene un efecto en el aumento de la longevidad.

En ratones, mutaciones o deficiencias en el eje GH/IGF1 que disminuyen la señalización de IIS (Bartke, 2005) pueden aumentar sustancialmente la longevidad. Recientes estudios han demostrado igualmente que la inhibición de la ruta de mTOR, ya sea por la eliminación de uno de efectores, S6K1 (Selman et al., 2009) o bien por su propia inhibición tras el tratamiento con rapamicina (Harrison et al., 2009) puede afectar al envejecimiento.

Es importante señalar que aunque la manipulación de los organismos invertebrados ha ayudado a descubrir genes y mecanismos que participan en envejecimiento y longevidad, el ratón es el mamífero más práctico para establecer si esos genes homólogos también están relacionados con envejecimiento en mamíferos, lo que conducirá a ensayos clínicos para tratamiento de enfermedades asociadas en humanos.

Sin ir más lejos, en nuestro laboratorio se han generado ratones transgénicos para Sirt1, gen homólogo de Sir2 de levaduras, nematodos y moscas. En estos tres organismos invertebrados se ha estudiado a lo largo de muchos años que esta proteína es clave para la longevidad (Kaeberlein et al., 1999; Rogina and Helfand, 2004; Tissenbaum and Guarente, 2001). Sin embargo los ratones que sobre-expresaban Sirt1 no tienen diferencias en longevidad en comparación con los ratones wt, aunque si presentaban un envejecimiento “más saludable” (Herranz et al., 2010). Aunque es necesario destacar que existen otras 6 sirtuinas en mamíferos y que la sobre-expresión de una de ellas quizá no sea suficiente para ver diferencias en el envejecimiento.

Por todo ello y aunque los datos en *C. elegans* y los datos en los modelos de ratón con el eje GH/IGF1 disminuido nos sugerían que PTEN podían tener un papel protector frente al envejecimiento, estudiamos este proceso y sus patologías asociadas en los ratones Pten<sup>tg</sup>. Si nos fijamos en las curvas de supervivencia (**Figura 48**) los ratones Pten<sup>tg</sup> presentan un aumento en su longevidad comparados con los ratones wt. Este aumento es de un 12% en machos y un 11% en hembras, aumentos comparables a otros casos como el estudio del aumento de longevidad mediante el tratamiento de ratones con rapamicina (Harrison et al., 2009) en el que el aumento es del 7%-15% en hembras y 5%-15% en machos. En el ratón S6K1-nulo podemos observar que este aumento en la longevidad sólo se observa en las hembras (19%). Efectos del género sobre el envejecimiento se han reflejado en otros estudios de ratones con el eje IIS afectado como los Igf1r<sup>+/-</sup> y los Irs1<sup>-/-</sup> (Holzenberger et al., 2003; Selman et al., 2008a). En muchos de los casos en el que el eje de señalización insulina/IGF1 está disminuido, al igual que en los ratones Pten<sup>tg</sup>, se ha visto un efecto sobre longevidad (en la **Tabla 2** se muestran todos los modelos animales así como una breve descripción de sus principales fenotipos).

Posteriormente nos preguntamos si este aumento de la longevidad de los ratones Pten<sup>tg</sup> se debía a un aumento de la protección frente al desarrollo de tumores (**Figura 49**). Al excluir los ratones que padecían cáncer de la curva de supervivencia pudimos observar que los ratones Pten<sup>tg</sup> tienen un aumento de la longevidad de un 30%, sugiriendo que Pten tiene un papel en envejecimiento independiente de su función supresora de

tumores como ocurre en otros modelos transgénicos que sobre-expresan genes supresores de tumores como el ratón p53<sup>tg</sup>/(p16/ARF)<sup>tg</sup> (Matheu et al., 2007).

El análisis de algunos marcadores moleculares de envejecimiento como se muestra en (Matheu et al., 2007) y (Wang et al., 2009) como  $\gamma$ H2AX y 53BP1 reveló que los ratones Pten<sup>tg</sup> tenían menos acumulación de daño en el hígado medido por ambos marcadores. También se analizó la coordinación neuromuscular durante el envejecimiento, aunque el hecho que los ratones Pten<sup>tg</sup> tengan un tamaño reducido puede afectar a esta prueba.

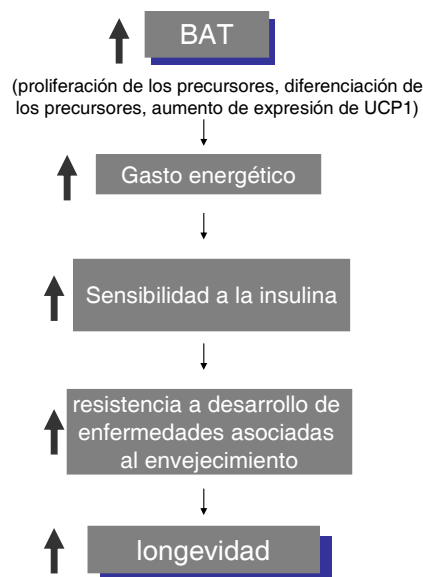
Otras de las características mejor estudiadas durante el envejecimiento es la progresiva resistencia a la insulina. Está muy documentado que la reducción de la función del eje insulina/IGF1 permite un aumento de longevidad en moscas y nematodos (Guarente and Kenyon, 2000; Tatar et al., 2003). En humanos, los individuos centenarios son sensibles a la insulina (Paolisso et al., 1996) y tienen una menor incidencia de diabetes (Kojima et al., 2004). En los ratones Pten<sup>tg</sup>, que también tienen menores niveles de IGF1 en sangre y existen unos menores niveles circulantes de insulina que a la larga se traduce en un aumento en la sensibilidad a esta hormona como nos muestran los índices HOMA-IR y QUICKI. En los ratones longevos con deficiencias en la ruta insulina/IGF1 se ha visto que una de sus características comunes es una mayor sensibilidad a la insulina por una menor exposición crónica a esta hormona. Dicha exposición crónica a la insulina permite una desensibilización de la señal y a la larga el desarrollo de resistencia a la insulina por la señal de retroalimentación negativa que regula esta ruta de señalización como ocurre en los ratones S6K1-nulos (Selman et al., 2009; Um et al., 2004). También se ha visto aumentada la sensibilidad a la insulina en ratones deficientes o resistentes a GH, en este caso debido a la reducción de la masa de los islotes pancreáticos lo que conlleva a una menor secreción de insulina (Liu et al., 2004), aumento en la secreción de adiponectina (Al-Regaiey et al., 2005) y expresión alterada de genes relacionados con la sensibilidad a la insulina como Ppar $\gamma$  y Pgc1 $\alpha$  (Al-Regaiey et al., 2005; Masternak et al., 2004; Masternak et al., 2005). En los ratones Pten<sup>tg</sup>, se ha estudiado la morfología de los islotes pancreáticos, la distribución de las células  $\beta$  y los niveles de adiponectina aunque no se han encontrado diferencias (datos no mostrados). Cabe destacar que los niveles de Pgc1 $\alpha$  sí son más elevados en el tejido adiposo marrón.



Se ha demostrado que la restricción calórica aumenta la longevidad en todos los organismos estudiados, ya que reduce el riesgo de desarrollar diabetes, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos y muchos tipos de cáncer (Fontana, 2008; Howell et al., 2009). El tejido adiposo marrón y la proteína Ucp1 están regulados por mecanismos moleculares que juegan papeles fundamentales sensibles a los cambios de ingesta y gasto energético. Se ha planteado incluso la posibilidad de que el tejido adiposo marrón pueda proteger al organismo del envejecimiento (Mattson, 2010). En humanos este tejido responde frente a la exposición al frío y esta respuesta se ha visto que está disminuida durante el envejecimiento (Saito et al., 2009). Además este tejido adiposo está inversamente relacionado con el índice de masa corporal (IMC) y la grasa visceral, consistente con una necesidad aumentada de termogénesis en los individuos más delgados y la noción de que el gasto energético llevado a cabo por el BAT puede contribuir al mantenimiento de un bajo IMC y poca acumulación de grasa visceral. Estudios en animales apoyan la idea de una reducida actividad del tejido adiposo marrón en organismos viejos. Se ha visto que la termogénesis mediada por el tejido adiposo marrón inducida ya sea por frío o por estimulación con norepinefrina está muy disminuida en ratas viejas comparadas con individuos jóvenes (McDonald and Horwitz, 1999). Además la reducción del tejido adiposo marrón durante el envejecimiento podría contribuir al aumento de acumulación de grasa visceral que típicamente ocurre a lo largo del envejecimiento. Hemos visto que los ratones *Pten<sup>tg</sup>* tienen una mayor actividad en el tejido adiposo marrón, que mimetiza el caso de la restricción calórica (aunque en nuestras manos el perfil de expresión de genes en dicho tejido entre los ratones *Pten<sup>tg</sup>* y los wt en restricción calórica no son los mismos) lo que podría contribuir a su retraso en el envejecimiento, aunque este punto se debería estudiar con más profundidad, con la generación de un ratón transgénico para *Pten* sólo en el tejido adiposo marrón y estudiar su envejecimiento y enfermedades asociadas.

Manipulaciones que puedan aumentar la masa y actividad del tejido adiposo marrón, aumentarán el gasto energético y reducirán la acumulación de grasa visceral, todo ello tendrá un efecto sobre la sensibilidad a la insulina lo que conducirá a un retraso en el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento (cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, diabetes) y tendrá un efecto positivo sobre la longevidad.





**Figura 60. Tejido adiposo marrón y longevidad.** Posible mecanismo por el que el tejido adiposo marrón podría proteger frente a la obesidad y otras enfermedades asociadas al envejecimiento

### 3. PTEN y cáncer.

Se ha estudiado a lo largo de los casi 14 años desde su descubrimiento la función de Pten y su papel en el desarrollo de múltiples tumores. Durante el transcurso de la tesis, hemos verificado su papel como supresor tumoral tanto en la inducción de tumores con el carcinógeno 3-metilcolantreno (3MC) como en el desarrollo de tumores espontáneos durante el envejecimiento de dichos ratones.

En el caso de la inducción de sarcomas por 3MC, decidimos la utilización de este protocolo ya que previamente se ha demostrado que la aparición de dichos tumores depende de p53 (Garcia-Cao et al., 2002). Además numerosos estudios demuestran la cooperación de p53 y PTEN. Se ha planteado que p53 actuando como factor de transcripción se une al promotor de Pten activando su transcripción después de un daño en el DNA producido por irradiación  $\gamma$  (Stambolic et al., 2001). Akt fosforila y activa a Mdm2 (Mayo and Donner, 2001; Zhou et al., 2001b), la ubiquitin ligasa que dirige a p53 a su degradación al proteosoma; Pten al contrarrestar la señalización de Akt, estaría estabilizando a p53 de forma indirecta e incluso se ha propuesto que Pten se une directamente a p53 lo que aumentaría la estabilidad de dicha proteína (Freeman et al., 2003). También se ha visto que la pérdida de Pten y p53 conlleva al desarrollo de carcinomas de vejiga (Puzio-Kuter et al., 2009) y aumenta la agresividad de los tumores

de próstata (Johnson and Janne, 2005). Por todo ello, aunque no se muestra en los resultados de esta tesis hemos empezado a generar colonias de ratones  $Pten^{tg}$  sin copias, con una copia o con tres copias de p53 (Garcia-Cao et al., 2006), para estudiar de una mejor manera la relación entre estos dos genes supresores de tumores.

Otros modelos de desarrollo de cáncer inducido genéticamente durante el transcurso de esta tesis ha sido el modelo TgMMTV-PyMT que desarrolla tumores de mama por la sobre-expresión de la proteína viral middle-T. Middle-T recluta a Src y activa de una manera constante a PI3K lo que aumenta la señalización de esta ruta mediada por AKT. Al comprobar que en fibroblastos murinos primarios, la sobre-expresión de Pten reducía de forma drástica el número de focos de transformación que se producían por Middle-T, decidimos cruzar los ratones  $Pten^{tg}$  con los ratones TgMMTV-PyMT. Resultado preliminares nos anuncian que en este fondo, la sobre-expresión de dos veces de Pten no es suficiente para retrasar la aparición de los tumores de mama generados por la sobre-expresión de PyMT (datos no mostrados).

También se ha estudiado el papel de Pten en tumores de colon e intestino (Di Cristofano et al., 1998) y además en los ratones  $Apc^{+/-}$  que desarrollan adenomas en el intestino delgado, la falta de Pten aumenta el grado de las lesiones. Por todo ello quisimos estudiar la sobre-expresión de Pten en un fondo  $Apc^{Min/+}$  (que desarrollan neoplasias intestinales múltiples) para ver cómo afecta dicha sobre-expresión al desarrollo de los tumores. Estos cruces se están llevando a cabo y por ello no podemos adelantar ningún resultado al término de la escritura de la tesis.

El estudio de los tumores espontáneos que se generaron durante el envejecimiento de los ratones wt y  $Pten^{tg}$  nos llevó a confirmar el papel de Pten como supresor tumoral ya que sólo el 43% ratones analizados murieron debido a tumores mientras que un porcentaje mucho mayor de wt (80%) murieron por esta causa. Además se vio muy reducida la incidencia de linfomas y sarcomas histiocíticos pero no la incidencia de tumores de hígado en concordancia con previos estudios donde se muestran que en los ratones  $Pten^{+/-}$  es infrecuente la aparición de tumores de hígado pero por el contrario, Pten si que juega un papel en el desarrollo de linfomas (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999; Stambolic et al., 2000). Por tanto el aumento de expresión de Pten confiere protección frente a la transformación neoplásica y cáncer.

En conjunto, los resultados de esta tesis nos han permitido profundizar sobre el papel del supresor de tumores Pten en su implicación sobre envejecimiento y metabolismo, La sobre-expresión de Pten protege frente al daño metabólico inducido por la dieta rica en grasa y aumenta el gasto energético debido a que poseen un tejido adiposo marrón más activo. Esto nos ha permitido explorar el impacto del uso de inhibidores de PI3K como activadores de la transcripción de Ucp1 y Pgc1 $\alpha$  en adipocitos marrones y su potencial uso para tratar la obesidad ya que hemos visto que tras el tratamiento con estos inhibidores aumenta el tejido adiposo marrón situado en el tejido adiposo blanco, se reduce la adiposidad y la esteatosis y finalmente se consigue una disminución significativa del peso corporal. Así pues, estos resultados proporcionan una prueba para el tratamiento terapéutico de la obesidad

## CONCLUSIONES



## Conclusiones

1. Hemos demostrado genéticamente que la protección al cáncer que confiere Pten es susceptible de ser aumentada sin incurrir en efectos secundarios deletéreos/negativos. Esto sugiere que los PI3Kis, a dosis moderadas, pueden ser beneficiosas en quimioprevención del cáncer.
2. Hemos demostrado genéticamente que Pten confiere longevidad en mamíferos, lo cual extiende la conservación evolutiva de la ruta de envejecimiento conocida como IIS.
3. Hemos demostrado genéticamente que Pten aumenta el gasto energético, lo cual ocurre al menos en parte por una activación de los adipocitos marrones. La consecuencia de este mayor gasto energético es una mayor protección al daño metabólico derivado de la dieta rica en grasas.
4. Los compuestos sintéticos que mimetizan a Pten, es decir, los PI3Kis son capaces de activar a los adipocitos marrones y de inducir pérdidas significativas y rápidas de peso en ratones obesos. En ratones no-obesos, el tratamiento con PI3Kis no induce pérdida de peso y no tiene efectos secundarios negativos.



## **BIBLIOGRAFÍA**





- Abate-Shen, C., Banach-Petrosky, W.A., Sun, X., Economides, K.D., Desai, N., Gregg, J.P., Borowsky, A.D., Cardiff, R.D., and Shen, M.M. (2003). Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer research* 63, 3886-3890.
- Accili, D., and Arden, K.C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117, 421-426.
- Adey, N.B., Huang, L., Ormonde, P.A., Baumgard, M.L., Pero, R., Byreddy, D.V., Tavtigian, S.V., and Bartel, P.L. (2000). Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer research* 60, 35-37.
- Al-Khouiri, A.M., Ma, Y., Togo, S.H., Williams, S., and Mustelin, T. (2005). Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *The Journal of biological chemistry* 280, 35195-35202.
- Al-Regaiey, K.A., Masternak, M.M., Bonkowski, M., Sun, L., and Bartke, A. (2005). Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* 146, 851-860.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr Biol* 7, 261-269.
- Ali, I.U., Schriml, L.M., and Dean, M. (1999). Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 1922-1932.
- Alvarez-Nunez, F., Bussaglia, E., Mauricio, D., Ybarra, J., Vilar, M., Lerma, E., de Leiva, A., and Matias-Guiu, X. (2006). PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* 16, 17-23.
- Anderson, R.M., Shanmuganayagam, D., and Weindruch, R. (2009). Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. *Toxicologic pathology* 37, 47-51.
- Arch, J.R. (2008). The discovery of drugs for obesity, the metabolic effects of leptin and variable receptor pharmacology: perspectives from  $\hat{\text{I}}^{23}$ -adrenoceptor agonists. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 378, 225-240.
- Arch, J.R., Hislop, D., Wang, S.J., and Speakman, J.R. (2006). Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *International journal of obesity* (2005) 30, 1322-1331.
- Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Developmental biology* 296, 164-176.
- Backman, S.A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M.S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G.O., *et al.* (2001). Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* 29, 396-403.
- Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q.J., Liu, Y., and Jiang, Y. (2007). Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science (New York, NY)* 318, 977-980.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse

white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American journal of physiology* 298, E1244-1253.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., *et al.* (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* 17, 200-205.

Bartke, A. (2005). Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* 146, 3718-3723.

Bartke, A. (2008). Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: novel findings. *Aging cell* 7, 285-290.

Bartke, A., Peluso, M.R., Moretz, N., Wright, C., Bonkowski, M., Winters, T.A., Shanahan, M.F., Kopchick, J.J., and Banz, W.J. (2004). Effects of Soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 36, 550-558.

Bayascas, J.R., and Alessi, D.R. (2005). Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Molecular cell* 18, 143-145.

Beiner, M.E., Rosen, B., Fyles, A., Harley, I., Pal, T., Siminovitch, K., Zhang, S., Sun, P., and Narod, S.A. (2006). Endometrial cancer risk is associated with variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1636-1640.

Berg, C.E., Lavan, B.E., and Rondinone, C.M. (2002). Rapamycin partially prevents insulin resistance induced by chronic insulin treatment. *Biochemical and biophysical research communications* 293, 1021-1027.

Biggs, W.H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7421-7426.

Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., and Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 11, 35-46.

Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F., and Carnero, A. (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28, 1379-1386.

Bluher, M., Kahn, B.B., and Kahn, C.R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science (New York, NY)* 299, 572-574.

Bluher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., and Kahn, C.R. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Developmental cell* 3, 25-38.

Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, C.J., and Bartke, A. (1996). Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384, 33.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

- Burgering, B.M. (2008). A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene* 27, 2258-2262.
- Burtner, C.R., Murakami, C.J., Kennedy, B.K., and Kaeberlein, M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 1256-1270.
- Cairns, P., Evron, E., Okami, K., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J.G., Bose, S., Wang, S.I., Parsons, R., and Sidransky, D. (1998). Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers. *Oncogene* 16, 3215-3218.
- Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J.G., Jen, J., Isaacs, W.B., Bova, G.S., and Sidransky, D. (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer research* 57, 4997-5000.
- Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A.K., Birnbaum, M.J., and Pilch, P.F. (1998). Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry* 273, 7201-7204.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.
- Cederberg, A., Gronning, L.M., Ahren, B., Tasken, K., Carlsson, P., and Enerback, S. (2001). FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 106, 563-573.
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science (New York, NY)* 292, 104-106.
- Clapham, J.C., and Arch, J.R. (2007). Thermogenic and metabolic antiobesity drugs: rationale and opportunities. *Diabetes, obesity & metabolism* 9, 259-275.
- Colman, E. (2007). Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul Toxicol Pharmacol* 48, 115-117.
- Coschigano, K.T., Clemmons, D., Bellush, L.L., and Kopchick, J.J. (2000). Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* 141, 2608-2613.
- Coschigano, K.T., Holland, A.N., Riders, M.E., List, E.O., Flyvbjerg, A., and Kopchick, J.J. (2003). Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* 144, 3799-3810.
- Cristofano, A.D., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348-355.
- Cypess, A.M. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360, 1509-1517.
- Chandarlapaty, S., Sawai, A., Scaltriti, M., Rodrik-Outmezguine, V., Grbovic-Huezo, O., Serra, V., Majumder, P.K., Baselga, J., and Rosen, N. (2011). AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer cell* 19, 58-71.

- Chen, S., Sanford, C.A., Sun, J., Choi, V., Van Dyke, T., Samulski, R.J., and Rathmell, W.K. (2010). VHL and PTEN loss coordinate to promote mouse liver vascular lesions. *Angiogenesis* 13, 59-69.
- Chow, J.Y., Quach, K.T., Cabrera, B.L., Cabral, J.A., Beck, S.E., and Carethers, J.M. (2007). RAS/ERK modulates TGFbeta-regulated PTEN expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 28, 2321-2327.
- Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., and Parker, M.G. (2005). RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Molecular and cellular biology* 25, 9383-9391.
- Chung, J.H., Ostrowski, M.C., Romigh, T., Minaguchi, T., Waite, K.A., and Eng, C. (2006). The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Human molecular genetics* 15, 2553-2559.
- Dallner, O.S., Chernogubova, E., Brolinson, K.A., and Bengtsson, T. (2006). Beta3-adrenergic receptors stimulate glucose uptake in brown adipocytes by two mechanisms independently of glucose transporter 4 translocation. *Endocrinology* 147, 5730-5739.
- Dan, H.C., Sun, M., Yang, L., Feldman, R.I., Sui, X.M., Ou, C.C., Nellist, M., Yeung, R.S., Halley, D.J., Nicosia, S.V., *et al.* (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *The Journal of biological chemistry* 277, 35364-35370.
- Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., Jr., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 41, 544-552.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science (New York, NY)* 278, 687-689.
- Deleris, P., Bacqueville, D., Gayral, S., Carrez, L., Salles, J.P., Perret, B., and Breton-Douillon, M. (2003). SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. *The Journal of biological chemistry* 278, 38884-38891.
- Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2001). Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet* 27, 222-224.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348-355.
- Dong-Dong, L., Xi-Ran, Z., and Xiang-Rong, C. (2003). Expression and significance of new tumor suppressor gene PTEN in primary liver cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 7, 67-71.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science (New York, NY)* 314, 467-471.
- Druker, B.J., Ling, L.E., Cohen, B., Roberts, T.M., and Schaffhausen, B.S. (1990). A completely transformation-defective point mutant of polyomavirus middle T antigen which retains full associated phosphatidylinositol kinase activity. *Journal of virology* 64, 4454-4461.

- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., and Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science (New York, NY)* 300, 1574-1577.
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.Z., Dirnhofer, S., and Hemmings, B.A. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* 26, 8042-8051.
- Eguez, L., Lee, A., Chavez, J.A., Miinea, C.P., Kane, S., Lienhard, G.E., and McGraw, T.E. (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* 2, 263-272.
- Eicher, E.M., and Beamer, W.G. (1976). Inherited ateliotic dwarfism in mice. Characteristics of the mutation, little, on chromosome 6. *The Journal of heredity* 67, 87-91.
- Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.
- English, J.T., Patel, S.K., and Flanagan, M.J. (1973). Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology* 107, 279-281.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M., and Longo, V.D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science (New York, NY)* 292, 288-290.
- Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008). Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 8, 347-358.
- Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metabolism* 9, 203-209.
- Fernandez-Marcos, P.J., Abu-Baker, S., Joshi, J., Galvez, A., Castilla, E.A., Canamero, M., Collado, M., Saez, C., Moreno-Bueno, G., Palacios, J., *et al.* (2009). Simultaneous inactivation of Par-4 and PTEN in vivo leads to synergistic NF-kappaB activation and invasive prostate carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12962-12967.
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A., and Harrison, D.E. (2001). Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6736-6741.
- Folkes, A.J., Ahmadi, K., Alderton, W.K., Alix, S., Baker, S.J., Box, G., Chuckowree, I.S., Clarke, P.A., Depledge, P., Eccles, S.A., *et al.* (2008). The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *Journal of medicinal chemistry* 51, 5522-5532.
- Fontana, L. (2008). Calorie restriction and cardiometabolic health. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15, 3-9.



- Fontana, L., and Klein, S. (2007). Aging, adiposity, and calorie restriction. *Jama* 297, 986-994.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V.D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science (New York, NY)* 328, 321-326.
- Forner, F., Kumar, C., Lubber, C.A., Fromme, T., Klingenspor, M., and Mann, M. (2009). Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab* 10, 324-335.
- Fredriksson, J.M., Nikami, H., and Nedergaard, J. (2005). Cold-induced expression of the VEGF gene in brown adipose tissue is independent of thermogenic oxygen consumption. *FEBS letters* 579, 5680-5684.
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., *et al.* (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer cell* 3, 117-130.
- Fridberg, M., Servin, A., Anagnostaki, L., Linderöth, J., Berglund, M., Söderberg, O., Enblad, G., Rosen, A., Mustelin, T., Jerkeman, M., *et al.* (2007). Protein expression and cellular localization in two prognostic subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: higher expression of ZAP70 and PKC-beta II in the non-germinal center group and poor survival in patients deficient in nuclear PTEN. *Leukemia & lymphoma* 48, 2221-2232.
- Friedman, J.M. (2009). Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *The American journal of clinical nutrition* 89, 973S-979S.
- Frisk, T., Foukakis, T., Dwight, T., Lundberg, J., Hoog, A., Wallin, G., Eng, C., Zedenius, J., and Larsson, C. (2002). Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 35, 74-80.
- Fujita, N., Sato, S., Katayama, K., and Tsuruo, T. (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry* 277, 28706-28713.
- Furnari, F.B., Huang, H.J., and Cavenee, W.K. (1998). The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer research* 58, 5002-5008.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell* 18, 13-24.
- Garami, A., Zwartkruis, F.J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S.C., Hafen, E., Bos, J.L., and Thomas, G. (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular cell* 11, 1457-1466.
- Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *The EMBO journal* 21, 6225-6235.
- Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Tomas-Loba, A., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2006). Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO reports* 7, 546-552.

- Georgescu, M.M., Kirsch, K.H., Akagi, T., Shishido, T., and Hanafusa, H. (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10182-10187.
- Georgescu, M.M., Kirsch, K.H., Kaloudis, P., Yang, H., Pavletich, N.P., and Hanafusa, H. (2000). Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer research* 60, 7033-7038.
- Gimm, O., Perren, A., Weng, L.P., Marsh, D.J., Yeh, J.J., Ziebold, U., Gil, E., Hinze, R., Delbridge, L., Lees, J.A., *et al.* (2000). Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *The American journal of pathology* 156, 1693-1700.
- Goodyear, L.J. (2008). The exercise pill--too good to be true? *The New England journal of medicine* 359, 1842-1844.
- Gronbaek, K., Zeuthen, J., Guldberg, P., Ralfkiaer, E., and Hou-Jensen, K. (1998). Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. *Blood* 91, 4388-4390.
- Guarente, L., and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408, 255-262.
- Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 12, 9-22.
- Guigon, C.J., Zhao, L., Willingham, M.C., and Cheng, S.Y. (2009). PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene* 28, 509-517.
- Guldberg, P., thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F., and Zeuthen, J. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer research* 57, 3660-3663.
- Gutierrez, A., Sanda, T., Grebliunaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y., Dahlberg, S., Neuberg, D., Moreau, L.A., Winter, S.S., *et al.* (2009). High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114, 647-650.
- Halachmi, N., Halachmi, S., Evron, E., Cairns, P., Okami, K., Saji, M., Westra, W.H., Zeiger, M.A., Jen, J., and Sidransky, D. (1998). Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 23, 239-243.
- Hansen, J.B., Jorgensen, C., Petersen, R.K., Hallenborg, P., De Matteis, R., Boye, H.A., Petrovic, N., Enerback, S., Nedergaard, J., Cinti, S., *et al.* (2004). Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4112-4117.
- Hansen, M., Chandra, A., Mitic, L.L., Onken, B., Driscoll, M., and Kenyon, C. (2008). A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS genetics* 4, e24.
- Harper, M.E., Green, K., and Brand, M.D. (2008). The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu Rev Nutr* 28, 13-33.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., *et al.* (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of cell biology* 166, 213-223.



- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., *et al.* (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392-395.
- Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P.M., Olefsky, J.M., and Kobayashi, M. (2000). A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 14, 783-794.
- Heaton, J.M. (1972). The distribution of brown adipose tissue in the human. *Journal of anatomy* 112, 35-39.
- Herranz, D., Munoz-Martin, M., Canamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nature communications* 1, 3.
- Hettinger, K., Vikhanskaya, F., Poh, M.K., Lee, M.K., de Belle, I., Zhang, J.T., Reddy, S.A., and Sabapathy, K. (2007). c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell death and differentiation* 14, 218-229.
- Himms-Hagen, J. (2004). Exercise in a pill: feasibility of energy expenditure targets. *Current drug targets* 3, 389-409.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182-187.
- Howell, A., Chapman, M., and Harvie, M. (2009). Energy restriction for breast cancer prevention. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung* 181, 97-111.
- Hresko, R.C., and Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 40406-40416.
- Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., *et al.* (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes & development* 23, 1327-1337.
- Huttunen, P., Hirvonen, J., and Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 46, 339-345.
- Ingram, D.K., and Reynolds, M.A. (1986). Assessing the predictive validity of psychomotor tests as measures of biological age in mice. *Experimental aging research* 12, 155-162.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* 17, 1829-1834.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 648-657.
- Inoue-Narita, T., Hamada, K., Sasaki, T., Hatakeyama, S., Fujita, S., Kawahara, K., Sasaki, M., Kishimoto, H., Eguchi, S., Kojima, I., *et al.* (2008). Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer research* 68, 5760-5768.

- Ishibashi, J., and Seale, P. (2010). Medicine. Beige can be slimming. *Science* (New York, NY 328, 1113-1114.
- Iwanaga, K., Yang, Y., Raso, M.G., Ma, L., Hanna, A.E., Thilaganathan, N., Moghaddam, S., Evans, C.M., Li, H., Cai, W.W., *et al.* (2008). Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer. *Cancer research* 68, 1119-1127.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 127, 125-137.
- Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V., and Jazwinski, S.M. (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *Faseb J* 14, 2135-2137.
- Johnson, B.E., and Janne, P.A. (2005). Selecting patients for epidermal growth factor receptor inhibitor treatment: A FISH story or a tale of mutations? *J Clin Oncol* 23, 6813-6816.
- Johnson, T.E. (2008). *Caenorhabditis elegans* 2007: the premier model for the study of aging. *Experimental gerontology* 43, 1-4.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development* 13, 2570-2580.
- Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J.V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16/C/EBP- $\beta$  transcriptional complex. *Nature* 460, 1154-1158.
- Kajimura, S., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2010). Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab* 11, 257-262.
- Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S. (2004). Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* 14, 885-890.
- Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D.G., and Lomax, M.A. (2007). C/EBP $\beta$  reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *The Journal of biological chemistry* 282, 24660-24669.
- Kenyon, C.J. (2010). The genetics of ageing. *Nature* 464, 504-512.
- King, J.C., Xu, J., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Carver, B.S., Leung, D.H., Taylor, B.S., Sander, C., Cardiff, R.D., Couto, S.S., *et al.* (2009). Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 41, 524-526.
- Koh, H.J., Brandauer, J., and Goodyear, L.J. (2008). LKB1 and AMPK and the regulation of skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11, 227-232.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 271, 31372-31378.
- Kohn, T., Takahashi, M., Manda, R., and Yokota, J. (1998). Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers. *Genes, chromosomes & cancer* 22, 152-156.

- Kojima, T., Kamei, H., Aizu, T., Arai, Y., Takayama, M., Nakazawa, S., Ebihara, Y., Inagaki, H., Masui, Y., Gondo, Y., *et al.* (2004). Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways. *Experimental gerontology* 39, 1595-1598.
- Kopecky, J., Clarke, G., Enerback, S., Spiegelman, B., and Kozak, L.P. (1995). Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *The Journal of clinical investigation* 96, 2914-2923.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.
- Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merkenschlager, M., Rajewsky, N., *et al.* (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132, 860-874.
- Kovacina, K.S., Park, G.Y., Bae, S.S., Guzzetta, A.W., Schaefer, E., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *The Journal of biological chemistry* 278, 10189-10194.
- Kozak, L.P., and Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *International journal of obesity* (2005) 32 Suppl 7, S32-38.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation* 114, 1299-1307.
- Kurlawalla-Martinez, C., Stiles, B., Wang, Y., Devaskar, S.U., Kahn, B.B., and Wu, H. (2005). Insulin hypersensitivity and resistance to streptozotocin-induced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue. *Molecular and cellular biology* 25, 2498-2510.
- Kwon, C.H., Zhao, D., Chen, J., Alcantara, S., Li, Y., Burns, D.K., Mason, R.P., Lee, E.Y., Wu, H., and Parada, L.F. (2008). Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer research* 68, 3286-3294.
- Kwon, C.H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L.L., Tharp, R., Smeyne, R.J., Eberhart, C.G., Burger, P.C., and Baker, S.J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* 29, 404-411.
- Lachyankar, M.B., Sultana, N., Schonhoff, C.M., Mitra, P., Poluha, W., Lambert, S., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Recht, L.D., Nabi, R., *et al.* (2000). A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* 20, 1404-1413.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., *et al.* (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127, 1109-1122.
- Lahtz, C., Stranzenbach, R., Fiedler, E., Helmbold, P., and Dammann, R.H. (2010). Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. *The Journal of investigative dermatology* 130, 620-622.
- Lakowski, B., and Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13091-13096.

- Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19, R1046-1052.
- Lean, M.E.J., and James, W.P.T. (1986). *Brown Adipose Tissue* (Nature Publishing Group), pp. 339-365.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., and Pavletich, N.P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323-334.
- Lee, S., Muniyappa, R., Yan, X., Chen, H., Yue, L.Q., Hong, E.G., Kim, J.K., and Quon, M.J. (2008). Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice. *American journal of physiology* 294, E261-270.
- Leonardsson, G., Steel, J.H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., *et al.* (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8437-8442.
- Leslie, N.R., and Downes, C.P. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *The Biochemical journal* 382, 1-11.
- Leslie, N.R., Maccario, H., Spinelli, L., and Davidson, L. (2009). The significance of PTEN's protein phosphatase activity. *Advances in enzyme regulation* 49, 190-196.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Li, A.G., Piluso, L.G., Cai, X., Wei, G., Sellers, W.R., and Liu, X. (2006). Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Molecular cell* 23, 575-587.
- Li, G., Robinson, G.W., Lesche, R., Martinez-Diaz, H., Jiang, Z., Rozengurt, N., Wagner, K.U., Wu, D.C., Lane, T.F., Liu, X., *et al.* (2002). Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development (Cambridge, England)* 129, 4159-4170.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., *et al.* (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science (New York, NY)* 275, 1943-1947.
- Li, X., Monks, B., Ge, Q., and Birnbaum, M.J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* 447, 1012-1016.
- Li, Y., Podsypanina, K., Liu, X., Crane, A., Tan, L.K., Parsons, R., and Varmus, H.E. (2001). Deficiency of Pten accelerates mammary oncogenesis in MMTV-Wnt-1 transgenic mice. *BMC molecular biology* 2, 2.
- Libina, N., Berman, J.R., and Kenyon, C. (2003). Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 115, 489-502.
- Lidell, M.E., and Enerback, S. (2010). Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nature reviews* 6, 319-325.

- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *The Journal of biological chemistry* 277, 1645-1648.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., *et al.* (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.
- Lin, S.J., Defossez, P.A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, NY)* 289, 2126-2128.
- Liu, J.L., Coschigano, K.T., Robertson, K., Lipsett, M., Guo, Y., Kopchick, J.J., Kumar, U., and Liu, Y.L. (2004). Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *American journal of physiology* 287, E405-413.
- Liu, J.L., Mao, Z., LaFortune, T.A., Alonso, M.M., Gallick, G.E., Fueyo, J., and Yung, W.K. (2007). Cell cycle-dependent nuclear export of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor is regulated by the phosphoinositide-3-kinase signaling cascade. *Cancer research* 67, 11054-11063.
- Liu, J.L., Sheng, X., Hortobagyi, Z.K., Mao, Z., Gallick, G.E., and Yung, W.K. (2005). Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. *Molecular and cellular biology* 25, 6211-6224.
- Lizcano, J.M., and Alessi, D.R. (2002). The insulin signalling pathway. *Curr Biol* 12, R236-238.
- Maccario, H., Perera, N.M., Davidson, L., Downes, C.P., and Leslie, N.R. (2007). PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *The Biochemical journal* 405, 439-444.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273, 13375-13378.
- Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S.D., and Partridge, L. (2003). Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science (New York, NY)* 301, 1731-1733.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Mao, J.H., Wu, D., Perez-Losada, J., Nagase, H., DelRosario, R., and Balmain, A. (2003). Genetic interactions between Pten and p53 in radiation-induced lymphoma development. *Oncogene* 22, 8379-8385.
- Marken Lichtenbelt, W.D. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360, 1500-1508.
- Marsit, C.J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P.W., Nelson, H.H., Wiencke, J.K., and Kelsey, K.T. (2005). PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human pathology* 36, 768-776.
- Masse, I., Molin, L., Billaud, M., and Solari, F. (2005). Lifespan and dauer regulation by tissue-specific activities of *Caenorhabditis elegans* DAF-18. *Developmental biology* 286, 91-101.

- Masternak, M.M., Al-Regaiey, K., Bonkowski, M.S., Panici, J., Sun, L., Wang, J., Przybylski, G.K., and Bartke, A. (2004). Divergent effects of caloric restriction on gene expression in normal and long-lived mice. *The journals of gerontology* 59, 784-788.
- Masternak, M.M., Al-Regaiey, K.A., Del Rosario Lim, M.M., Jimenez-Ortega, V., Panici, J.A., Bonkowski, M.S., Kopchick, J.J., and Bartke, A. (2005). Effects of caloric restriction and growth hormone resistance on the expression level of peroxisome proliferator-activated receptors superfamily in liver of normal and long-lived growth hormone receptor/binding protein knockout mice. *The journals of gerontology* 60, 1394-1398.
- Matheu, A., Maraver, A., Collado, M., Garcia-Cao, I., Canamero, M., Borrás, C., Flores, J.M., Klatt, P., Vina, J., and Serrano, M. (2009). Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging cell* 8, 152-161.
- Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borrás, C., Flores, J.M., Vina, J., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448, 375-379.
- Matheu, A., Maraver, A., and Serrano, M. (2008). The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer research* 68, 6031-6034.
- Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., and Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes & development* 18, 2736-2746.
- Matsumoto, M., Han, S., Kitamura, T., and Accili, D. (2006). Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *The Journal of clinical investigation* 116, 2464-2472.
- Matsumoto, M., Poci, A., Rossetti, L., Depinho, R.A., and Accili, D. (2007). Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab* 6, 208-216.
- Mattson, M.P. (2010). Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing research reviews* 9, 69-76.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11598-11603.
- McDonald, R.B., and Horwitz, B.A. (1999). Brown adipose tissue thermogenesis during aging and senescence. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31, 507-516.
- Melnikova, I., and Wages, D. (2006). Anti-obesity therapies. *Nature Rev Drug Discov* 5, 369-370.
- Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., and Patel, T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 130, 2113-2129.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647-658.
- Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *The Biochemical journal* 404, 1-13.



- Mihaylova, V.T., Borland, C.Z., Manjarrez, L., Stern, M.J., and Sun, H. (1999). The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7427-7432.
- Miller, S.J., Lou, D.Y., Seldin, D.C., Lane, W.S., and Neel, B.G. (2002). Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS letters* 528, 145-153.
- Mitchell, J.R., Jacobsson, A., Kirchgessner, T.G., Schotz, M.C., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1992). Regulation of expression of the lipoprotein lipase gene in brown adipose tissue. *The American journal of physiology* 263, E500-506.
- Mulero, F., Donate, L.E., and Serrano, M. (2011). Imaging cancer in mice by PET/CT, and combined PET-CT. *Current Protocols in Mouse Biology*, 85-103.
- Munger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J.M., and Howley, P.M. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer surveys* 12, 197-217.
- Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13513-13518.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* 11, 268-272.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (2010). The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* 11, 268-272.
- Ni, Y.G., Wang, N., Cao, D.J., Sachan, N., Morris, D.J., Gerard, R.D., Kuro, O.M., Rothermel, B.A., and Hill, J.A. (2007). FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20517-20522.
- Nikami, H., Shimizu, Y., Endoh, D., Yano, H., and Saito, M. (1992). Cold exposure increases glucose utilization and glucose transporter expression in brown adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 185, 1078-1082.
- O'Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., *et al.* (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* 66, 1500-1508.
- Okahara, F., Ikawa, H., Kanaho, Y., and Maehama, T. (2004). Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *The Journal of biological chemistry* 279, 45300-45303.
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R.M., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *The Journal of biological chemistry* 281, 26562-26568.
- Ozes, O.N., Akca, H., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Maehama, T., Dixon, J.E., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/ mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4640-4645.

- Padmanabhan, S., Mukhopadhyay, A., Narasimhan, S.D., Tesz, G., Czech, M.P., and Tissenbaum, H.A. (2009). A PP2A regulatory subunit regulates *C. elegans* insulin/IGF-1 signaling by modulating AKT-1 phosphorylation. *Cell* 136, 939-951.
- Palmero, I., and Serrano, M. (2001). Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods in enzymology* 333, 247-256.
- Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A.P., *et al.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18261-18266.
- Palomero, T., Sulis, M.L., Cortina, M., Real, P.J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S.L., *et al.* (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nature medicine* 13, 1203-1210.
- Paolisso, G., Gambardella, A., Ammendola, S., D'Amore, A., Balbi, V., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. (1996). Glucose tolerance and insulin action in healthy centenarians. *The American journal of physiology* 270, E890-894.
- Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C.P., Smith, S.A., and Macphee, C.H. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol* 11, 764-768.
- Perlemuter, G., Bigorgne, A., Cassard-Doulcier, A.M., and Naveau, S. (2007). Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nature clinical practice* 3, 458-469.
- Perren, A., Komminoth, P., Saremaslani, P., Matter, C., Feurer, S., Lees, J.A., Heitz, P.U., and Eng, C. (2000). Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *The American journal of pathology* 157, 1097-1103.
- Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., and Tschop, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9793-9798.
- Piper, M.D., Selman, C., McElwee, J.J., and Partridge, L. (2008). Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *Journal of internal medicine* 263, 179-191.
- Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1563-1568.
- Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, M.S., Hobbs, R.M., Sportoletti, P., Varmeh, S., Egia, A., Fedele, G., *et al.* (2010a). Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Science signaling* 3, ra29.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P. (2010b). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465, 1033-1038.
- Potter, C.J., Pedraza, L.G., and Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* 4, 658-665.



- Puc, J., and Parsons, R. (2005). PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 4, 927-929.
- Puig, O., and Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes & development* 19, 2435-2446.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., *et al.* (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423, 550-555.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews* 24, 78-90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Puzio-Kuter, A.M., Castillo-Martin, M., Kinkade, C.W., Wang, X., Shen, T.H., Matos, T., Shen, M.M., Cordon-Cardo, C., and Abate-Shen, C. (2009). Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes & development* 23, 675-680.
- Qiao, L.Y., Zhande, R., Jetton, T.L., Zhou, G., and Sun, X.J. (2002). In vivo phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents. *The Journal of biological chemistry* 277, 26530-26539.
- Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H., and Georgescu, M.M. (2003). PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Molecular and cellular biology* 23, 6139-6149.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO journal* 23, 1761-1769.
- Rigoutsos, I., and Furnari, F. (2010). Gene-expression forum: Decoy for microRNAs. *Nature* 465, 1016-1017.
- Risinger, J.I., Hayes, A.K., Berchuck, A., and Barrett, J.C. (1997). PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer research* 57, 4736-4738.
- Rogina, B., and Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15998-16003.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1, S130-135.
- Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.
- Saito, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58, 1526-1531.

- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., *et al.* (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58, 1526-1531.
- Sakai, A., Thieblemont, C., Wellmann, A., Jaffe, E.S., and Raffeld, M. (1998). PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 92, 3410-3415.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)* 307, 1098-1101.
- Scime, A., Grenier, G., Huh, M.S., Gillespie, M.A., Bevilacqua, L., Harper, M.E., and Rudnicki, M.A. (2005). Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* 2, 283-295.
- Schade, B., Rao, T., Dourdin, N., Lesurf, R., Hallett, M., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2009). PTEN deficiency in a luminal ErbB-2 mouse model results in dramatic acceleration of mammary tumorigenesis and metastasis. *The Journal of biological chemistry* 284, 19018-19026.
- Schaible, R., and Gowen, J.W. (1961). A new dwarf mouse. *Genetics* 46, 896.
- Seale, P. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6, 38-54.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* 6, 38-54.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Schuster, E., Blanc, E., *et al.* (2008a). Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *Faseb J* 22, 807-818.
- Selman, C., Lingard, S., Gems, D., Partridge, L., and Withers, D.J. (2008b). Comment on "Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis". *Science (New York, NY)* 320, 1012; author reply 1012.
- Selman, C., Tullet, J.M., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S.J., Choudhury, A.I., Claret, M., Al-Qassab, H., Carmignac, D., Ramadani, F., *et al.* (2009). Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science (New York, NY)* 326, 140-144.
- Selman, C., and Withers, D.J. (2011). Mammalian models of extended healthy lifespan. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 366, 99-107.
- Shao, J., Washington, M.K., Saxena, R., and Sheng, H. (2007). Heterozygous disruption of the PTEN promotes intestinal neoplasia in APC<sup>min</sup>/+ mouse: roles of osteopontin. *Carcinogenesis* 28, 2476-2483.

- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., and Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128, 157-170.
- Snell, G.D. (1929). Dwarf, a New Mendelian Recessive Character of the House Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 15, 733-734.
- Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., and Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science (New York, NY)* 305, 1163-1167.
- Soria, J.C., Lee, H.Y., Lee, J.I., Wang, L., Issa, J.P., Kemp, B.L., Liu, D.D., Kurie, J.M., Mao, L., and Khuri, F.R. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 8, 1178-1184.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular cell* 8, 317-325.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.
- Stambolic, V., Tsao, M.S., Macpherson, D., Suzuki, A., Chapman, W.B., and Mak, T.W. (2000). High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in *pten*<sup>+/-</sup> mice. *Cancer research* 60, 3605-3611.
- Stanger, B.Z., Stiles, B., Lauwers, G.Y., Bardeesy, N., Mendoza, M., Wang, Y., Greenwood, A., Cheng, K.H., McLaughlin, M., Brown, D., *et al.* (2005). Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer cell* 8, 185-195.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., *et al.* (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15, 356-362.
- Stiles, B., Wang, Y., Stahl, A., Bassilian, S., Lee, W.P., Kim, Y.J., Sherwin, R., Devaskar, S., Lesche, R., Magnuson, M.A., *et al.* (2004). Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2082-2087.
- Summers, S.A., and Birnbaum, M.J. (1997). A role for the serine/threonine kinase, Akt, in insulin-stimulated glucose uptake. *Biochemical Society transactions* 25, 981-988.
- Sundqvist, A., Bengoechea-Alonso, M.T., Ye, X., Lukiychuk, V., Jin, J., Harper, J.W., and Ericsson, J. (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* 1, 379-391.
- Sutherland, J.C., Callahan, W.P., Jr., and Campbell, G.L. (1952). Hibernoma: a tumor of brown fat. *Cancer* 5, 364-368.
- Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., *et al.* (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8, 1169-1178.
- Tachibana, M., Shibakita, M., Ohno, S., Kinugasa, S., Yoshimura, H., Ueda, S., Fujii, T., Rahman, M.A., Dhar, D.K., and Nagasue, N. (2002). Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 94, 1955-1960.

- Taguchi, A., Wartschow, L.M., and White, M.F. (2007). Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* (New York, NY 317, 369-372.
- Takahashi, Y., Morales, F.C., Kreimann, E.L., and Georgescu, M.M. (2006). PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. *The EMBO journal* 25, 910-920.
- Takakura, S., Mitsutake, N., Nakashima, M., Namba, H., Saenko, V.A., Rogounovitch, T.I., Nakazawa, Y., Hayashi, T., Ohtsuru, A., and Yamashita, S. (2008). Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer science* 99, 1147-1154.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., *et al.* (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.
- Tashiro, H., Blazes, M.S., Wu, R., Cho, K.R., Bose, S., Wang, S.I., Li, J., Parsons, R., and Ellenson, L.H. (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer research* 57, 3935-3940.
- Tatar, M., Bartke, A., and Antebi, A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* (New York, NY 299, 1346-1351.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., *et al.* (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4401-4406.
- Tissenbaum, H.A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.
- Todaro, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology* 17, 299-313.
- Toivonen, J.M., and Partridge, L. (2009). Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Molecular and cellular endocrinology* 299, 39-50.
- Torres, J., and Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry* 276, 993-998.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., and Greenberg, M.E. (2003). The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003, RE5.
- Tremblay, F., Brule, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., Sun, X.J., Krebs, M., Polakiewicz, R.D., Thomas, G., *et al.* (2007). Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14056-14061.
- Tremblay, F., and Marette, A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 38052-38060.
- Trotman, L.C., Niki, M., Dotan, Z.A., Koutcher, J.A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A.S., Roy-Burman, P., Greenberg, N.M., Van Dyke, T., *et al.* (2003). Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS biology* 1, E59.

- Trotman, L.C., and Pandolfi, P.P. (2003). PTEN and p53: who will get the upper hand? *Cancer cell* 3, 97-99.
- Trotman, L.C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N.P., Carver, B.S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128, 141-156.
- Tsuruta, H., Kishimoto, H., Sasaki, T., Horie, Y., Natsui, M., Shibata, Y., Hamada, K., Yajima, N., Kawahara, K., Sasaki, M., *et al.* (2006). Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer research* 66, 8389-8396.
- Tzatsos, A., and Kandror, K.V. (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 26, 63-76.
- Um, S.H., D'Alessio, D., and Thomas, G. (2006). Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 3, 393-402.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., *et al.* (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200-205.
- Utermark, T., Schaffhausen, B.S., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2007). The p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase is essential for polyomavirus middle T antigen-mediated transformation. *Journal of virology* 81, 7069-7076.
- van der Horst, A., and Burgering, B.M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 440-450.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* 360, 1500-1508.
- van Nederveen, F.H., Perren, A., Dannenberg, H., Petri, B.J., Dinjens, W.N., Komminoth, P., and de Krijger, R.R. (2006). PTEN gene loss, but not mutation, in benign and malignant pheochromocytomas. *The Journal of pathology* 209, 274-280.
- Vazquez, F., Grossman, S.R., Takahashi, Y., Rokas, M.V., Nakamura, N., and Sellers, W.R. (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *The Journal of biological chemistry* 276, 48627-48630.
- Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N., and Sellers, W.R. (2000). Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Molecular and cellular biology* 20, 5010-5018.
- Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular biology* 20, 1868-1876.
- Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., Berriel Diaz, M., Rozman, J., Hrabe de Angelis, M., Nusing, R.M., *et al.* (2010). Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science (New York, NY)* 328, 1158-1161.



- Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 28, 721-726.
- Virolle, T., Adamson, E.D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., and de Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nature cell biology* 3, 1124-1128.
- Virtanen, K.A. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360, 1518-1525.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S., *et al.* (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* 360, 1518-1525.
- Vivanco, I., Palaskas, N., Tran, C., Finn, S.P., Getz, G., Kennedy, N.J., Jiao, J., Rose, J., Xie, W., Loda, M., *et al.* (2007). Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer cell* 11, 555-569.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell* 8, 311-323.
- Wang, H., Douglas, W., Lia, M., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Podsypanina, K., Parsons, R., and Ellenson, L.H. (2002). DNA mismatch repair deficiency accelerates endometrial tumorigenesis in Pten heterozygous mice. *The American journal of pathology* 160, 1481-1486.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., *et al.* (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer cell* 4, 209-221.
- Wang, S.I., Puc, J., Li, J., Bruce, J.N., Cairns, P., Sidransky, D., and Parsons, R. (1997). Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer research* 57, 4183-4186.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* 20, 4370-4379.
- Wang, X., Trotman, L.C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., *et al.* (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 128, 129-139.
- Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L.M., and Longo, V.D. (2009). Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS genetics* 5, e1000467.
- Wei, Q., Clarke, L., Scheidenhelm, D.K., Qian, B., Tong, A., Sabha, N., Karim, Z., Bock, N.A., Reti, R., Swoboda, R., *et al.* (2006). High-grade glioma formation results from postnatal pten loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model. *Cancer research* 66, 7429-7437.
- Weindruch, R., and Walford, R.L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science (New York, NY)* 215, 1415-1418.

- Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., *et al.* (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & development* 20, 2096-2109.
- Whelan, J.T., Forbes, S.L., and Bertrand, F.E. (2007). CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 6, 80-84.
- Whiteman, D.C., Zhou, X.P., Cummings, M.C., Pavey, S., Hayward, N.K., and Eng, C. (2002a). Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *International journal of cancer* 99, 63-67.
- Whiteman, E.L., Cho, H., and Birnbaum, M.J. (2002b). Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13, 444-451.
- Wijesekara, N., Konrad, D., Eweida, M., Jefferies, C., Liadis, N., Giacca, A., Crackower, M., Suzuki, A., Mak, T.W., Kahn, C.R., *et al.* (2005). Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Molecular and cellular biology* 25, 1135-1145.
- Wing, R.R., and Phelan, S. (2005). Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr* 82, 222S-225S.
- Withers, D.J., Burks, D.J., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., and White, M.F. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23, 32-40.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.
- Wong, J.T., Kim, P.T., Peacock, J.W., Yau, T.Y., Mui, A.L., Chung, S.W., Sossi, V., Doudet, D., Green, D., Ruth, T.J., *et al.* (2007). Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity. *Diabetologia* 50, 395-403.
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E., and Sawyers, C.L. (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15587-15591.
- Xia, D., Srinivas, H., Ahn, Y.H., Sethi, G., Sheng, X., Yung, W.K., Xia, Q., Chiao, P.J., Kim, H., Brown, P.H., *et al.* (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 282, 3507-3519.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature immunology* 9, 405-414.
- Xu, X., Ehdaie, B., Ohara, N., Yoshino, T., and Deng, C.X. (2010). Synergistic action of Smad4 and Pten in suppressing pancreatic ductal adenocarcinoma formation in mice. *Oncogene* 29, 674-686.
- Yamamoto, H., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 21, 1745-1755.

- Yamaza, H., Komatsu, T., Wakita, S., Kijogi, C., Park, S., Hayashi, H., Chiba, T., Mori, R., Furuyama, T., Mori, N., *et al.* (2010). FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging cell* 9, 372-382.
- Yan, L., Vatner, D.E., O'Connor, J.P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., Hirotsu, S., Ishikawa, Y., Sadoshima, J., and Vatner, S.F. (2007). Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 130, 247-258.
- Yanagi, S., Kishimoto, H., Kawahara, K., Sasaki, T., Sasaki, M., Nishio, M., Yajima, N., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, H., *et al.* (2007). Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice. *The Journal of clinical investigation* 117, 2929-2940.
- Yao, Y.J., Ping, X.L., Zhang, H., Chen, F.F., Lee, P.K., Ahsan, H., Chen, C.J., Lee, P.H., Peacocke, M., Santella, R.M., *et al.* (1999). PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 18, 3181-3185.
- You, M.J., Castrillon, D.H., Bastian, B.C., O'Hagan, R.C., Bosenberg, M.W., Parsons, R., Chin, L., and DePinho, R.A. (2002). Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1455-1460.
- Yu, J., Zhang, S.S., Saito, K., Williams, S., Arimura, Y., Ma, Y., Ke, Y., Baron, V., Mercola, D., Feng, G.S., *et al.* (2009). PTEN regulation by Akt-EGR1-ARF-PTEN axis. *The EMBO journal* 28, 21-33.
- Zhande, R., Mitchell, J.J., Wu, J., and Sun, X.J. (2002). Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Molecular and cellular biology* 22, 1016-1026.
- Zhang, J.G., Wang, J.J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., and Yang, G.H. (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 411, 846-852.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao, J.J., Cheng, H., Jia, S., Wang, L., Gjoerup, O.V., Mikami, A., and Roberts, T.M. (2006). The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16296-16300.
- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A.C., Hiller, D.J., Chen, A.J., Perry, S.R., Tonon, G., Chu, G.C., Ding, Z., *et al.* (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 455, 1129-1133.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001a). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature cell biology* 3, 245-252.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001b). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology* 3, 973-982.
- Zhou, X.P., Kuismanen, S., Nystrom-Lahti, M., Peltomaki, P., and Eng, C. (2002). Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. *Human molecular genetics* 11, 445-450.



Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T.E., *et al.* (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13215-13220.

Zingaretti, M.C. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* 23, 3113-3120.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757-768.

**ANEXO**

**PUBLICACIONES**



Artículos publicados directamente relacionados con la presente Tesis Doctoral:

**Ortega-Molina A**, Efeyan A, Muñoz-Martín M, Gomez G, Cañamero M, Mulero F, Pastor J, Martínez S, M.Valverde A, Romanos E, Bischoff JR, Serrano M. (2011). Pten overexpression in mice increases energy expenditure and survival. *Nature*, under revision

Otros artículos publicados

Efeyan A, **Ortega-Molina A**, Velasco-Miguel S, Herranz D, Vassilev LT, Serrano M. (2007). Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res.* 67, 7350-7357.

Efeyan A, Murga M, Martinez-Pastor B, **Ortega-Molina A**, Soria R, Collado M, Fernández-Capetillo O, Serrano M. (2009). Limited role of murine ATM in oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression. *PLoS One.* 4, e5475.

Kabacik S, **Ortega-Molina A**, Efeyan A, Finnon P, Bouffler S, Serrano M, Badie C.(2011). A minimally invasive assay for individual assessment of the ATM/CHEK2/p53 pathway activity. *Cell Cycle.* 10(7):1152-61.

## **Pten overexpression in mice increases energy expenditure and survival**

Ana Ortega-Molina<sup>1</sup>, Alejo Efeyan<sup>1</sup>, Maribel Muñoz-Martin<sup>1</sup>, Gonzalo Gomez<sup>2</sup>,  
Marta Cañamero<sup>3</sup>, Francisca Mulero<sup>4</sup>, Joaquin Pastor<sup>5</sup>, Sonia Martinez<sup>5</sup>, Angela  
M. Valverde<sup>6</sup>, Eduardo Romanos<sup>7</sup>, James R. Bischoff<sup>6</sup>, Manuel Serrano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Tumour Suppression Group*

<sup>2</sup> *Bioinformatics Unit*

<sup>3</sup> *Comparative Pathology Unit*

<sup>4</sup> *Molecular Imaging Unit*

<sup>5</sup> *Experimental Therapeutics Programme  
Spanish National Cancer Research Centre (CNIO)  
Madrid, Spain*

<sup>6</sup> *Institute of Biomedicine Alberto Sols (CSIC/UAM), Madrid, Spain  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades  
Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Spain.*

<sup>7</sup> *Phenotyping Unit  
Aragon Health Sciences Institute (I+CS)  
Zaragoza, Spain*

\* *correspondence to:* [mserrano@cnio.es](mailto:mserrano@cnio.es)

**Key words:** Pten / ageing / brown adipose tissue / energy expenditure

Decreased signalling of insulin and Igf1 increases longevity across animal evolution, including mammals<sup>1,2</sup>. The effects of insulin/Igf1 on aging are intracellularly mediated by the PI3K/Akt/Foxo pathway in worms and flies<sup>1,2</sup>. Here, we have extended this paradigm to mammals by directly attenuating PI3K signalling in mice through moderate overexpression of the tumour suppressor *Pten* under its own transcriptional regulatory elements. *Pten*<sup>tg</sup> mice have lower levels of PI3K signalling, are protected from cancer, and present a significant extension of lifespan that is independent of their lower cancer incidence. Interestingly, *Pten*<sup>tg</sup> mice show an elevated rate of energy expenditure, which is accompanied by decreased adiposity and protection from high-fat diet-induced liver damage. Accounting for the elevated energy expenditure, we found that brown and white adipose tissues from *Pten*<sup>tg</sup> mice express high levels of the uncoupling protein Ucp1 and its transcriptional activator Pgc1 $\alpha$ , and the relative uptake of glucose by brown adipose tissue (BAT) is constitutively increased. Also, the BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice contains lower levels of phosphorylated Akt, which is a negative regulator of both Pgc1 $\alpha$  and its critical partner Foxo1<sup>3-6</sup>. In support of this, a synthetic PI3K inhibitor elevates the expression of Pgc1 $\alpha$  and Ucp1 in *in vitro*-differentiated brown adipocytes, as well as, in the BAT of adult mice. Finally, *Pten*<sup>tg</sup> fibroblasts programmed *in vitro* with Prdm16 and C/EBP $\beta$ , master factors for brown adipocyte differentiation<sup>7,8</sup>, formed ectopic subcutaneous brown adipose pads more efficiently than similarly programmed non-transgenic fibroblasts, altogether indicating that the effects of Pten on brown adipocytes are cell autonomous. These observations extend to mammals the evolutionary conserved modulation of organism survival by the PI3K pathway and uncover a role of Pten in promoting energy expenditure by brown adipocytes, thus decreasing the caloric input to the rest of the organism and its associated damage.

Tumour suppressors are specialized in protecting cells from damage and, in this context, it is conceivable that they could also provide defence against aging<sup>9</sup>. Evidence of a convergent protection of cancer and aging exists for tumour suppressors p53, Ink4a and Arf<sup>10,11</sup>. Here, we have tested this paradigm for the tumour suppressor Pten, which together with p53, Ink4a and Arf, constitute the four more important tumour suppressors in mammals as evidenced by their high frequency of inactivation and the wide range of tumour types where they are inactivated.

The most prominent function of Pten is to counteract the activity of phosphatidylinositol 3-kinases type I (PI3K)<sup>12</sup>. These kinases mediate signals triggered by insulin, insulin-like growth factors, and many other molecules generally involved in cellular growth and proliferation. Activation of PI3K is followed by the activation of Akt, which, in turn, triggers a complex cascade of events that includes the inhibition of Foxo transcription factors, as well as, feedback loops that ensure that the activity of the pathway is kept within limits<sup>13-17</sup>. A number of genetically-modified animals with decreased activity of the Insulin and Igf1 Signalling (IIS) axis are characterized by an extended longevity

<sup>1,2</sup>. In the case of the nematode *Caenorhabditis elegans*, decreased PI3K (AGE-1) activity results in extended longevity<sup>18,19</sup> and decreased Pten (DAF-18) activity in shortened survival<sup>20</sup>. In the case of mammals, a variety of mice with decreased IIS activity have an extended longevity<sup>21</sup> and lower levels of PI3K/Akt<sup>22-25</sup>. Also, caloric restriction (CR) is a robust anti-aging intervention<sup>2</sup> and, in mice, it is associated to decreased levels of Igf1 and reduced basal levels of PI3K pathway activity<sup>26-28</sup>. However, direct inhibition of PI3K/Akt in mice has not been informative regarding longevity because severe inhibition of these kinases results in pathological defects, diseases and premature lethality<sup>29</sup>.

In an attempt to augment Pten activity without incurring in overt imbalances, we performed transgenesis with a *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) carrying a large (127 kb) intact genomic segment that includes the complete murine *Pten* gene (**Supp. Fig. 1**). In this manner, we obtained a transgenic mouse line, *Pten*<sup>tg</sup>, that expresses ~2x-fold levels of Pten relative to their wild-type littermates across all examined tissues, including *Mouse Embryo Fibroblasts* (MEFs) ( $2.3 \pm 0.4$ ; **Fig. 1a**). Transgenic mice were fertile and viable, although analysis of the segregation of the *Pten*<sup>tg</sup> allele indicated that the frequency of weaned transgenic mice was lower than expected (approx. 50% lower) (**Supp. Table 1**). Examination of embryos at an advanced stage of gestation (E13.5) showed equal proportions of wt and transgenic genotypes (**Supp. Table 1**) albeit transgenic embryos were noticeably smaller than wt embryos (**Supp. Fig. 2**). We surmise that the small size of the transgenic pups could cause abandonment by the mothers and early postnatal lethality. It is worth mentioning that a similarly high proportion of postnatal lethality has been reported for the long-lived dwarf mice deficient in the growth hormone receptor (*Ghr*)<sup>30</sup>. The functionality of the *Pten* transgene was validated genetically by its ability to rescue the completely penetrant embryonic lethality associated to the homozygous deletion of the endogenous *Pten* alleles<sup>31</sup>. In particular, upon performing the appropriate crosses, we obtained viable transgenic mice homozygously null for the endogenous alleles (*i.e.* *Pten*<sup>-/-;tg</sup>) (**data not shown**). Moreover, the presence of the transgene completely rescued the early cancer lethality of *Pten*<sup>+/-</sup> mice (**Supp. Fig. 3**).

The impact of Pten overexpression on PI3K signalling was confirmed in primary MEFs under standard culture conditions where the basal levels of Pten protein were clearly augmented in association with lower levels of phosphorylated Akt (phospho-Ser473-Akt) (**Fig. 1b**). Also, insulin-triggered PI3K signalling was attenuated as judged by the levels of phospho-Ser473-Akt and phospho-Thr308-Akt, as well as, phospho-Thr32-Foxo3 and phospho-Thr24-Foxo1 (**Fig. 1c** and **Supp. Fig. 4**). Next, we asked whether the *Pten* transgene was able to protect primary MEFs from oncogenic transformation. For this, we introduced into MEFs the papilloma virus oncoprotein E6, which efficiently inactivates p53, together with either oncogenic EGFR (EGFR<sup>L858R</sup>) or with polyoma virus oncoprotein middle-T, whose oncogenic activities are known to be strictly dependent on PI3K signalling<sup>32,33</sup>. In both cases, *Pten*<sup>tg</sup> MEFs were significantly more resistant than wt MEFs to oncogenic transformation (**Fig. 1d**). Finally, we examined whether tumour suppression, the archetypical activity of Pten, was enhanced in *Pten*<sup>tg</sup> mice. This was evaluated, first, using a chemical carcinogenesis assay consisting

in intramuscular injection of 3-methyl-cholanthrene (3MC). This aggressive cancer model generates fibrosarcomas in all the treated mice, but *Pten*<sup>tg</sup> mice showed a significantly extended tumour-free survival compared to wt mice (**Fig. 1e**). Additionally, we performed complete histological exploration of aged moribund mice and scored the incidence of tumours (malignant and pre-malignant), as well as other pathologies (**Supp. Table 2**). Interestingly, the percentage of old moribund mice with cancer (*i.e.* malignant tumours) was significantly reduced in the *Pten*<sup>tg</sup> group relative to wt mice (**Fig. 1f**). Several cancer types, most notably lymphomas and histiocytic sarcomas (also known as histiocytic lymphomas), were significantly reduced in the *Pten*<sup>tg</sup> cohort (**Fig. 1f**). Liver cancers were a notable exception in the sense that the transgene had no impact on their incidence (**Fig. 1f**). These observations are in concordance with the fact that *Pten* haploinsufficiency does not result in liver tumours but in a multitude of other tumour types, notably including lymphomas<sup>31,34,35</sup>. We conclude that the *Pten*<sup>tg</sup> allele is functional and provides protection against neoplastic transformation and cancer.

To address the impact of *Pten* on healthspan and longevity, we followed cohorts of *Pten*<sup>tg</sup> mice, together with their wt littermates, during their entire lifespan (**Supp. Tables 3, 4**). Importantly, both male and female *Pten*<sup>tg</sup> mice showed a significant increase in longevity as indicated by their Kaplan-Meier survival curves, median survival and maximal lifespan (**Fig. 2a**; **Supp. Tables 5, 6**; and **Supp. Fig. 5**). In particular, the mean longevity of the oldest 20% mice was significantly increased both in males (+16%) and in females (+7%) (*p* values of 0.003 and 0.05, respectively; see **Supp. Table 6**). Additional statistical tests (Cox regression) indicated that the increased survival was dependent on the transgene and independent of other variables, such as the identity of the parents or date of birth, (**Supp. Table 7**). We also wondered whether the effect of the transgene in longevity was a consequence of its protective effect on cancer. However, cancer-free *Pten*<sup>tg</sup> mice still presented an increased longevity when compared with cancer-free wt mice (**Fig. 2b**). This indicates that *Pten*<sup>tg</sup> extends longevity independently of its effect on cancer protection and suggests a direct impact on healthspan. The accumulation of DNA damage within tissues, and particularly in the liver, is a robust biomarker of aging<sup>10,36</sup>. Immunofluorescence with two markers of DNA damage,  $\gamma$ H2AX and 53BP1, indicated a significantly lower level of DNA damage in the liver of old *Pten*<sup>tg</sup> mice compared to wt controls (**Fig. 2c**). Also, old transgenic mice performed better in the tightrope test than wt controls (**Supp. Fig. 6**), further suggesting improved healthspan, although interpretation of this test is confounded by the different weight of the mice (see below). A widespread feature of long-lived mice with decreased IIS axis activity is their improved insulin sensitivity<sup>21</sup>. This effect, apparently paradoxical, is explained by the concomitant reduction in the negative feedback routes that emanate from the insulin signalling pathway<sup>13,14,17</sup>. In keeping with this, *Pten*<sup>tg</sup> mice had lower fasting levels of glucose and insulin (**Supp. Fig. 7**) and a significantly lower value of the insulin resistance indexes HOMA-IR (**Fig. 2d**) and QUICKI (**Supp. Fig. 7**), which are both derived from the glucose and insulin levels. We also examined the level of inhibitory Ser/Thr-phosphorylations in Irs1 in *White Adipose Tissue* (WAT). Old *Pten*<sup>tg</sup> mice showed reduced levels of phosphorylated Akt and, interestingly, also presented lower levels of



phosphorylated-Ser636/639-Irs1 compared to their wt controls and (**Fig. 2e**). The lower phosphorylation of Irs1 at Ser636/639 may reflect lower levels of negative feedback regulation by S6K1<sup>37</sup> and, in agreement with this, we found lower levels of phosphorylation of the S6K1 substrate S6 in the WAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice compared to wt controls (**Supp. Fig. 8**). These data support the concept that improved insulin sensitivity in *Pten*<sup>tg</sup> mice results from compensatory feedback mechanisms that ensure homeostasis. Incidentally, serum levels of Igf1 were moderately, but significantly, lower in *Pten*<sup>tg</sup> mice compared to wt mice, both at young and old age, and cholesterol levels were also lower in *Pten*<sup>tg</sup> mice (**Supp. Fig. 7**). All together, we conclude that moderate and regulated overexpression of *Pten* results in extended survival and improved healthspan.

In an effort to shed light into the physiological mechanisms that could be involved in the extended lifespan of *Pten*<sup>tg</sup> mice, we have explored their metabolism. *Pten*<sup>tg</sup> mice presented a decreased body weight (**Fig. 3a**) (27% and 28% decrease in young males and females mice, respectively, and 35% and 44% in old males and females; **Supp. Fig. 9**). Interestingly, this lower weight occurred despite the fact that *Pten*<sup>tg</sup> mice were hyperphagic (**Fig. 3b** and **Supp. Fig. 10**). We wondered whether this could be a result of increased energy expenditure. Indirect calorimetry indicated that *Pten*<sup>tg</sup> mice have an increased energy expenditure relative to their total body weight and under normal housing conditions (23°C, and access to drink and food) (**Fig. 3c**). However, application of more stringent statistical tests (General Linear Model (GLM) and ANalysis of COVariance (ANCOVA)) could not detect a significant impact of the transgene on energy expenditure under these conditions. To improve the sensitivity of the calorimetric measurements, we scored the Resting Metabolic Rate (RMR) at 23°C and, more importantly, at 30°C (thermoneutrality) in the absence of drink and food. This minimizes the contributions of physical activity, food processing, and body temperature maintenance on energy expenditure, thus allowing a more accurate evaluation of the differences in basal metabolism. Moreover, due to the different body composition of the *Pten*<sup>tg</sup> mice (see below), we followed recent recommendations regarding the use of lean mass rather than total body weight for normalization<sup>38</sup>. Importantly, *Pten*<sup>tg</sup> mice had an increased RMR relative to lean mass, both at 23°C and 30°C (**Fig. 3d**). Even more, in this case, GLM analyses indicated that the transgene has a statistically significant impact on metabolic rate, which is independent of its effect on lean mass (**Supp. Fig. 11**). No significant changes were detected in the respiratory quotient (**Supp. Fig. 12**). Locomotor activity and body temperature were similar between the two cohorts of mice (**Supp. Fig. 13, 14**), thus excluding these factors as possible explanations for the increased energy expenditure, and implying an elevated metabolic rate as responsible for the observed increase in energy expenditure. High levels of energy expenditure are generally associated to reduced nutrient storage and protection from metabolic damage. In support of this, Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA) indicated that *Pten*<sup>tg</sup> mice had a relative decrease in fat mass (**Fig. 3e** and **Supp. Fig. 15**). Also, compared to wt controls, the weight of the epididymal WAT relative to body weight was significantly lower in young transgenic males (**Supp. Fig. 16**), and the size of the adipocytes in the epididymal WAT was smaller (**Fig. 3f**). *Pten*<sup>tg</sup> mice under High-Fat Diet (HFD) for 6 months increased their body weight to a similar relative extent as wt mice (**Supp. Fig. 17**). However, in

contrast to wt mice, *Pten*<sup>tg</sup> mice under HFD did not develop liver steatosis (**Fig. 3g**). Together, these results indicate that moderate upregulation of *Pten* results in increased energy expenditure, lower nutrient overload and improved protection against metabolic damage.

The most efficient mechanism to dissipate energy is through brown adipocytes, which are located both at the *Brown Adipose Tissue* (BAT) and, also, interspersed within the WAT<sup>39,40</sup>. Brown adipocytes have gained considerable attention since the recent recognition of their relevance in adult humans<sup>41</sup>. Macroscopically, the interscapular BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice had a more intense colour compared to wt BAT and, histologically, it presented a denser appearance due to reduced size of the multilocular lipid droplets (**Fig. 4a**), which is suggestive of higher BAT activity. To directly assess the constitutive activity of the BAT we measured <sup>18</sup>F-deoxyglucose (FDG) uptake by *Positron Electron Tomography* (PET). Importantly, the uptake of glucose was significantly higher in the BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice compared to the BAT of wt mice (**Fig. 4b**). Energy dissipation in brown adipocytes is mediated by the uncoupling protein *Ucp1*<sup>39</sup>. Remarkably, the expression levels of *Ucp1* were significantly higher in the BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice compared to their wt littermates (**Fig. 4c**). In relation to this, it is worth to mention that mice lacking the insulin receptor (IR) in the BAT also present higher levels of *Ucp1* expression<sup>42</sup>. The transcriptional co-activator *Pgc1α* is a critical positive regulator of *Ucp1* expression and regulates multiple metabolic responses including the induction of fatty acid oxidation<sup>43-45</sup>. Interestingly, *Pgc1α* together with some genes involved in fatty acid oxidation were also significantly upregulated in the BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice (**Fig. 4c**). Other genes characteristic of brown adipocytes were not significantly altered (**Supp. Fig. 18**). Both *Pgc1α* and *Ucp1* are characteristically expressed in brown, but not in white, adipocytes<sup>43,44</sup> and, therefore, their detection in WAT is indicative of the presence of brown adipocytes within WAT<sup>39,40</sup>. Analysis of epididymal WAT indicated the presence of significantly higher levels of *Pgc1α* and *Ucp1* expression in transgenic mice compared to wt mice (**Supp. Fig. 19**), thus suggesting higher activity in the brown adipocytes that reside within the WAT. Incidentally, we wondered whether caloric restriction (CR) would exert a similar transcriptional response in the BAT, but mice under CR for 4 weeks presented lower, rather than higher, levels of *Pgc1α* and normal levels of *Ucp1* in the BAT (**Supp. Fig. 20**), thus suggesting that the *Pten* transgene and CR are different in this regard. In the liver, the transcriptional factor *Foxo1* is an essential partner for the function of *Pgc1α*<sup>4,6</sup>, and *Akt* phosphorylates and inhibits both *Pgc1α*<sup>5</sup> and *Foxo* proteins<sup>46,47</sup>. Based on this, we examined whether the BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice also had lower levels of phosphorylated *Akt* and *Foxo1*. Indeed, immunodetection of these proteins revealed that transgenic BAT had lower levels of active *Akt* (phospho-Ser473-*Akt*), as well as, lower levels of phosphorylated *Foxo1* (phospho-Thr24-*Foxo1*) (**Fig. 4d**). In addition to the BAT, muscle is another important organ responsible for energy expenditure. In particular, overexpression of *Pgc1α* or small compounds that activate *Pgc1α* through *Sirt1* induce a change in muscle myofibers from type II (low oxidative capacity) to type I (high oxidative capacity)<sup>48,49</sup> and, in some cases, this is associated to an increased energy expenditure<sup>49</sup>. Examination of succinate dehydrogenase in the gastrocnemius muscle (containing both types of myofibers), as well as, the mRNA levels characteristic of type I

myofibers did not support the concept that the *Pten*<sup>tg</sup> mice have a relative increase in type I myofibers (**Supp. Fig. 21**). This reinforces the idea that the increased energy expenditure observed in *Pten*<sup>tg</sup> mice is due to a higher activity of brown adipocytes.

The mechanisms of action of Pten go beyond the inhibition of PI3K<sup>50</sup>. To establish the involvement of PI3K on the above reported effects of Pten in BAT, we inhibited PI3K in two different systems of *in vitro*-cultured brown adipocytes. For this, we used a small compound inhibitor of PI3K developed at the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), named “CNIO-compound A”, and abbreviated here as PI3Ki (see **Methods** and **Supp. Fig. 22**). Preadipocytes 3T3-L1 ectopically expressing C/Ebpβ were differentiated into brown adipocytes<sup>51</sup> (**Supp. Fig. 23**) and treatment with PI3Ki resulted severe decrease in the levels of phospho-Akt (**Supp. Fig. 24**) and upregulation of *Ucp1* and *Pgc1a*, both when alone or in combination with forskolin (an activator of AMP cyclase known to upregulate *Ucp1* levels<sup>43</sup>) (**Fig. 4e**). To further support this, treatment of immortalized neonatal pre-brown adipocytes (three independent lines) with PI3Ki also upregulated the expression of *Ucp1* and similar results were obtained with differentiated brown adipocytes (**Fig. 4e** and **Supp. Fig. 23, 24**). Finally, treatment of mice with PI3Ki resulted in significant upregulation of *Ucp1* and *Pgc1a* in the BAT, as well as *Lcad* involved in fatty acid oxidation (**Fig. 4f** and **Supp. Fig. 25**). These results indicate that downregulation of PI3K is responsible, at least in part, for the effects of *Pten* overexpression in the BAT of *Pten*<sup>tg</sup> mice.

The above results demonstrate that PI3K inhibition has cell autonomous effects that can be recapitulated *in vitro* with cultured brown adipocytes. To further extend this concept, we took advantage of the transcriptional factor Prdm16 and its cofactor C/Ebpβ, whose combined expression is able to program fibroblasts to form subcutaneous BAT-containing fat pads upon transplantation<sup>7,8</sup>. Immortalized wt and *Pten*<sup>tg</sup> MEFs were programmed with retroviruses encoding Prdm16 and C/Ebpβ, and injected subcutaneously into nude mice. Two months later, ectopic fat pads with depots of BAT were identified at the injection sites (**Fig. 4g** and **Supp. Fig. 26**). Quantification of the amount of BAT formed indicated that *Pten*<sup>tg</sup> cells were significantly more efficient at generating BAT than their wt counterparts (**Fig. 4h**). These results confirm that *Pten* exerts a cell-autonomous effect on BAT, and open a route to improve the generation of ectopic BAT transplants. All together, these observations reveal a novel function of Pten as a positive regulator of energy dissipation in brown adipocytes.

In worms and flies, the IIS longevity pathway is intracellularly mediated by the PI3K/Akt/Foxo pathway. Our findings with *Pten* transgenic mice, extend the evolutionary conservation of this intracellular longevity pathway to mammals. In a wider scope and together with previous reports<sup>10,11</sup>, the four main tumour suppressors, namely, p53, Ink4a, Arf, and Pten, increase organismal survival independently of their effects on cancer protection, thus revealing an intimate connection between longevity and cancer protection. Our data uncover a role of Pten in the regulation of nutrient combustion by brown adipocytes. This puts forward a new mechanism to explain the longevity effects of decreased IIS/PI3K pathway activity. In particular, increased energy expenditure by BAT reduces the

295 caloric input available to the rest of the organism and, in this manner, mimics a  
296 caloric restriction state that would ameliorate the pathological effects of nutrient  
297 overload. In turn, this may contribute to improve healthspan and prolong  
298 organismal survival.

### Acknowledgements

We are grateful to Bruce Spiegelman, Shingo Kajimura, Karl Kaiyala, Carlos Dieguez and Roger Gomis for advice and reagents. We are also thankful to Cristina Pantoja for help and advice, Gema Iglesias for animal handling, and Javier Martin and Sagrario Ortega for mouse transgenesis. A.O.-M. is recipient of a predoctoral contract of the Regional Government of Madrid. Work in the laboratory of M.S. is funded by the CNIO and by grants from the Spanish Ministry of Science (SAF and CONSOLIDER), the Regional Government of Madrid (GsSTEM), the European Union (PROTEOMAGE), the European Research Council (ERC Advanced Grant), and the “Marcelino Botin” Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Authors Contributions

A.O.-M. performed most of the experiments, contributed to experimental design, data analysis, discussion and writing the paper; A.E. contributed to experimental design, data analysis and discussion; M.M.-M. performed all the mouse manipulations; G.G. performed the statistical analyses; M.C. performed and diagnosed the histology and pathology; F.M. performed the imaging analyses by DXA and PET; J.P., S.M. and J.R.B. designed, synthesized and characterized the small molecular weight PI3Ki “CNIO-compound A”; A.M.V. generated the immortalized brown adipocyte lines and provided critical advise; E.R. performed indirect calorimetry, activity and temperature measurements; M.S. designed and supervised the study, secured funding, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

The authors declare no competing financial interests with this paper.

## References

1. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504-512 (2010).
2. Fontana, L., Partridge, L. & Longo, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* **328**, 321-326 (2010).
3. Daitoku, H., Yamagata, K., Matsuzaki, H., Hatta, M. & Fukamizu, A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* **52**, 642-649 (2003).
4. Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-555 (2003).
5. Li, X., Monks, B., Ge, Q. & Birnbaum, M. J. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* **447**, 1012-1016 (2007).
6. Matsumoto, M., Poci, A., Rossetti, L., Depinho, R. A. & Accili, D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab* **6**, 208-216 (2007).
7. Seale, P. *et al.* Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* **6**, 38-54 (2007).
8. Kajimura, S. *et al.* Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* **460**, 1154-1158 (2009).
9. Serrano, M. & Blasco, M. A. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 715-722 (2007).
10. Matheu, A. *et al.* Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* **448**, 375-379 (2007).
11. Matheu, A. *et al.* Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell* **8**, 152-161 (2009).
12. Chalhoub, N. & Baker, S. J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* **4**, 127-150 (2009).
13. Puig, O. & Tjian, R. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* **19**, 2435-2446 (2005).
14. Matsumoto, M., Han, S., Kitamura, T. & Accili, D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J Clin Invest* **116**, 2464-2472 (2006).
15. Um, S. H., D'Alessio, D. & Thomas, G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* **3**, 393-402 (2006).
16. Carracedo, A. & Pandolfi, P. P. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**, 5527-5541 (2008).
17. Kamagate, A. *et al.* Forkhead box O1 links hepatic insulin action to endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* **151**, 3521-3535 (2010).
18. Dorman, J. B., Albinder, B., Shroyer, T. & Kenyon, C. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 1399-1406 (1995).
19. Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A. & Ruvkun, G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 536-539 (1996).

20. Mihaylova, V. T., Borland, C. Z., Manjarrez, L., Stern, M. J. & Sun, H. The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7427-7432 (1999).
21. Bartke, A. Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: novel findings. *Aging Cell* **7**, 285-290 (2008).
22. Holzenberger, M. *et al.* IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421**, 182-187 (2003).
23. Hsieh, C. C. & Papaconstantinou, J. Akt/PKB and p38 MAPK signaling, translational initiation and longevity in Snell dwarf mouse livers. *Mech Ageing Dev* **125**, 785-798 (2004).
24. Sharp, Z. D. & Bartke, A. Evidence for down-regulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR)-dependent translation regulatory signaling pathways in Ames dwarf mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **60**, 293-300 (2005).
25. Al-Regaiey, K. A., Masternak, M. M., Bonkowski, M., Sun, L. & Bartke, A. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor i/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* **146**, 851-860 (2005).
26. Jiang, W., Zhu, Z. & Thompson, H. J. Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. *Cancer Res* **68**, 5492-5499 (2008).
27. Moore, T. *et al.* Dietary energy balance modulates signaling through the Akt/mammalian target of rapamycin pathways in multiple epithelial tissues. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **1**, 65-76 (2008).
28. Hempenstall, S., Picchio, L., Mitchell, S. E., Speakman, J. R. & Selman, C. The impact of acute caloric restriction on the metabolic phenotype in male C57BL/6 and DBA/2 mice. *Mech Ageing Dev* **131**, 111-118 (2010).
29. Renner, O. & Carnero, A. Mouse models to decipher the PI3K signaling network in human cancer. *Curr Mol Med* **9**, 612-625 (2009).
30. Coschigano, K. T. *et al.* Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* **144**, 3799-3810 (2003).
31. Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* **19**, 348-355 (1998).
32. Zhao, J. J. *et al.* The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16296-16300 (2006).
33. Utermark, T., Schaffhausen, B. S., Roberts, T. M. & Zhao, J. J. The p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase is essential for polyomavirus middle T antigen-mediated transformation. *J Virol* **81**, 7069-7076 (2007).
34. Podsypanina, K. *et al.* Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1563-1568 (1999).

35. Stambolic, V. *et al.* High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten+/- mice. *Cancer Res* **60**, 3605-3611 (2000).
36. Wang, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* **8**, 311-323 (2009).
37. Um, S. H. *et al.* Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200-205 (2004).
38. Butler, A. A. & Kozak, L. P. A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes* **59**, 323-329 (2010).
39. Kozak, L. P. & Anunciado-Koza, R. UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**, S32-38 (2008).
40. Nedergaard, J. & Cannon, B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* **11**, 268-272 (2010).
41. Lidell, M. E. & Enerback, S. Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat Rev Endocrinol* **6**, 319-325 (2010).
42. Guerra, C. *et al.* Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* **108**, 1205-1213 (2001).
43. Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839 (1998).
44. Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* **24**, 78-90 (2003).
45. Vega, R. B., Huss, J. M. & Kelly, D. P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* **20**, 1868-1876 (2000).
46. Kops, G. J. *et al.* Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**, 630-634 (1999).
47. van der Horst, A. & Burgering, B. M. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 440-450 (2007).
48. Lin, J. *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801 (2002).
49. Feige, J. N. *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* **8**, 347-358 (2008).
50. Song, M. S. *et al.* Nuclear PTEN Regulates the APC-CDH1 Tumor-Suppressive Complex in a Phosphatase-Independent Manner. *Cell* **144**, 187-199 (2011).
51. Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D. G. & Lomax, M. A. C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem* **282**, 24660-24669 (2007).



## METHODS

**Transgenesis.** To generate the *Pten*<sup>tg</sup> mouse strain, the Bacterial Artificial Chromosome (BAC) RP24-372O16 (obtained from CHORI; <http://www.chori.org>) (**Supp. Fig. 1**) was linearized using PI-SceI (New England Biolabs) and 2  $\mu$ l of a solution containing 0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l were microinjected into the pronuclei of fertilized oocytes derived from intercrosses between (C57BL6 x CBA)F1 mice. Founders were mated with C57BL6 mice and the resulting progeny, which was of genetic background C57BL6/CBA (75%:25%), was analyzed for transmission of the transgene, integrity of the transgene, and number of integration sites. Analysis of integrity and transmission was checked by PCR amplification of the two terminal regions of the genomic insert, namely, T7-O16 (Fw-T7: 5'-CCG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG-3'; Rv-T7: 5'-TCA TCT CGG CTC CAT CGT TT-3') and SP6-O16 (Fw-Sp6: 5'-GTC GAC ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG-3'; Rv-Sp6: 5'-GAT GCT GTG TGC TAC AGG GAT G-3'). A transgenic line was selected with a single integration site. This line was expanded by intercrosses with non-transgenic littermates and, therefore, all the mice used in this study are C57BL6/CBA (75%:25%).

**Animal experimentation.** Mice were fed either with a standard chow diet (Harlan Teklad 2018, 18% calories from fat) or, when indicated, with a high fat diet (Research Diets D12451, 45% of total calories from fat). All mice were observed weekly by trained personnel. Upon signs of morbidity, mice were closely inspected daily until application of Humane End Point (HEP) criteria (<http://dels.nas.edu/global/ilar/Guide>). From our experience, the humane end point is applied when the life expectancy of the mice is on average shorter than one week. Mice that died spontaneously (Death In Cage or DIC) had a sudden death and were not preceded by detectable morbidity. For 3-methyl-cholanthrene (3MC) carcinogenesis, we followed previously described methods<sup>52</sup>. Briefly, 2 months old mice (males and females) received a single intramuscular injection at one of the rear legs of a 100  $\mu$ L solution containing 3MC (Sigma), at a concentration of 100  $\mu$ g/ $\mu$ L and dissolved in sesame oil (Sigma). The time point at which tumours reach 1.5 cm maximum diameter was scored<sup>53</sup>.

**Metabolic measurements.** To measure food intake, mice were housed in metabolic cages during 5 days, and food and water intake, as well as, the output of faeces and urine were measured during the last 4 days. Body composition (fat and lean content) was determined by Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA) (Lunar PIXImus Densitometer, GE Medical Systems). Image acquisition lasted 5 minutes with mice under anaesthesia by inhalation of 2% isofluorane in 100% oxygen. The analysis of lean mass and fat mass was performed using a Region Of Interest (ROI) comprising the entire body. Indirect calorimetry was performed following standard methods using Oxylet System metabolic chambers (Panlab Harvard Apparatus). Mice were in the measurement cages 12 hr previous to data recording. Room temperature was 23°C and light/dark cycles were of 12 hr. Volume of consumed O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) and eliminated CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>) were recorded every 24 min (4 simultaneous metabolic chambers, with a sample period of 4 min per cage, plus 1 min purge per cage). Respiratory Quotient (RQ) was calculated as:  $RQ = VCO_2 / VO_2$ . Energy Expenditure (EE) was calculated as:  $EE =$

$(3.815 + (1.232 \times RQ)) \times VO_2 \times 1.44$ ). Resting Metabolic Rate (RMR) was calculated as the 3 lowest  $VO_2$  measurements<sup>54</sup>. For the RMR at thermoneutrality (30°C), mice were acclimated for 1 week at 30°C and were introduced into the metabolic chambers at 9:00, in the absence of food and drink, and the recording from 14:00 to 17:00 (3 h) was used to obtain the average of the three lowest  $VO_2$  values<sup>54</sup>.

**Measurement of glucose uptake by PET.** Analyses were performed during the morning and in non-fasted mice. PET analysis was done following optimized methods previously described by us<sup>55</sup>. Mice were briefly anesthetized with a continuous flow of 1% to 3% isoflurane/oxygen mixture (2 l/min) and were injected with 500  $\mu$ Ci of  $^{18}$ F-FDG into the tail vein in a volume of 0.1 ml. Mice were conscious and at 23°C for FDG distribution and uptake during 45 min. For image acquisition, mice were anesthetized as before, and images (one bed, 30 min) were acquired using eXplore Vista PET (GE Healthcare). Quantitative evaluations were performed on the scans reconstructed by filter-back projection. The BAT was drawn as a Volume Of Interest (VOI) and total  $^{18}$ F-FDG counts were obtained. To measure the average Standardized Uptake Value (SUVave), we used the following formula:  $SUVave = [\text{uptake (MBq)/volume of the VOI (cc)}] / [\text{mouse weight (g)} \times \text{injected FDG dose (MBq)} \times \text{calibration factor}]$ .

**Serum analyses.** Serum Igf1 levels were measured by ELISA (Mouse/Rat IGF-1 ELISA; Demeditec). Fasting (over night) serum glucose was measured using Glucocard strips (A. Meranini Diagnosis). Fasting (over night) insulin levels were determined by ELISA (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA kit; Crystal Chem Inc.). Insulin sensitivity was evaluated by the HOmeostatic Model Assessment index (HOMA-IR =  $[(\text{fasting insulin, } \mu\text{U/ml}) \times (\text{fasting glucose, mg/dl})] / 405$ ) and the Quantitative Insulin sensitivity Check Index (QUICKI =  $1 / [\text{Log}(\text{fasting insulin, } \mu\text{U/ml}) + \text{Log}(\text{fasting glucose, mg/dl})]$ ). Serum cholesterol and thyroxine were determined using VetScan rotors (Abaxis Veterinary Diagnostics). Serum leptin was determined by ELISA (Crystal Chem Inc.). Serum adiponectin was determined by ELISA (Invitrogen). Blood was collected from tail tip (glucose and insulin), from the sub-mandibular vein (Igf1, cholesterol and thyroxine), or from post-mortem heart puncture (leptin and adiponectin).

**PI3K inhibitor.** The low molecular weight compound “CNIO-compound A” is covered by patent WO2010/119264 (files available at the World Intellectual Property Organization, <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2010119264>). In summary, this is a potent inhibitor of PI3K isoforms p110 $\alpha$  ( $K_i$ =2.4 nM) and p110 $\delta$  ( $K_i$ =9.8 nM) (inhibition of the other PI3K isoforms p110 $\beta$  and p110 $\gamma$  had values of  $K_i$ >100 nM, and inhibition of a total of 282 additional kinases including mTOR and DNAPK required concentrations of  $IC_{50} > 1 \mu\text{M}$ ). Full description of “CNIO-compound A” will be reported elsewhere. For *in vitro* assays, “CNIO-compound A” was added at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$ , as indicated. For *in vivo* assays, “CNIO-compound A” was administered orally by gavage at a dose of 15 mg/kg. Mice were sacrificed 6 h after and tissues were extracted and analyzed. Treated mice were C57BL6 males, 3 months old.

**Cellular assays.** *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs) were isolated at E13.5 as previously described<sup>56</sup>. For insulin stimulation, primary MEFs were serum starved (0% FBS) for 12 h, followed by 60 min incubation with PBS and then stimulated with 1  $\mu$ g/ml of insulin (Sigma) during 30 min. For oncogenic transformation, primary MEFs were retrovirally transduced with pLXSN-neo-E6 and either pWZL-blast-middle-T (kindly provided by Jean Zhao, Dana-Farber Cancer Institute, Boston) or pBABE-puro-EGFRL858R (kindly provided by William Sellers and Matthew Meyerson, Addgene plasmid #11012)<sup>57</sup>. After the corresponding drug selection 20,000 cells were plated in 10 cm diameter plates, and 2 weeks later were fixed and stained with 20% Giemsa. Immortalized brown adipocyte cell lines were obtained from the interscapular BAT of 3-5 day-old neonates, treated with and cultured as previously described<sup>58</sup>. For immortalization, cultures were retrovirally transduced with Large-T antigen (in vector pBABE-puro, kindly provided by James de Caprio, Dana Farber Cancer Institute, Boston). For the reprogramming of 3T3-L1 adipocytes into brown-adipocytes, we followed the method previously reported<sup>51</sup>. Briefly, 3T3-L1 cells were retrovirally transduced with pBABE-puro-Cebpb (kindly provided by Roger R. Gomis, IRB, Barcelona). Cells, either 3T3-L1/Cebpb or pre-brown adipocytes, were grown to confluence and subsequently cultured for 48 h with “differentiation medium” (DMEM 10% FBS, 20 nM insulin, 1 nM T3, 1 $\mu$ M rosiglitazone, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 125 nM indomethacin, 5  $\mu$ M dexamethasone). After this, cells were exposed to “maintenance medium” (DMEM 10% FBS, 20 nM insulin, 1 nM T3) for 4 days. For the experiment shown in **Fig. 4e**, differentiated 3T3-L1/Cebpb cells, or non-differentiated neonatal immortalized pre-brown adipocytes, or differentiated brown adipocytes were PBS washed and treated with “regular medium” (DMEM 10% FBS) containing 10  $\mu$ M forskolin (Sigma) and/or or “CNIO-compound A” for 4 h (1  $\mu$ M in the case of 3T3-L1/Cebpb and non-differentiated pre-brown adipocytes, and 10  $\mu$ M in the case of differentiated brown adipocytes).

**Generation of ectopic BAT.** *In vitro* programming of MEFs and subsequent transplantation to generate brown adipocytes was performed essentially as previously described<sup>8</sup>. Briefly, primary MEFs were first immortalized with pLXSN-neo-E6, and then retrovirally transduced with pBABE-puro-Prdm16 (kindly provided by Bruce Spiegelman, Addgene plasmid 15504)<sup>7</sup> and pBABE-puro-Cebpb (kindly provided by Roger R. Gomis, IRB, Barcelona). After drug selection, *Prdm16/Cebpb*-transduced fibroblasts were expanded and injected subcutaneously (10 million cells per injection site) into nude mice (males, 10 weeks old). After 2 months, mice were sacrificed. Grafted adipose pads were often visible. The skin around the injection site was processed for histology. Serial sections were scanned and examined. In some cases, ectopic fat was not identified (see quantification in **Fig. 4h**). The areas occupied by BAT were quantified, excluding WAT or other, such as granuloma.

**Protein analyses.** Lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.2, 0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 1% deoxycholate, 5 mM EDTA) was used to prepare protein extracts. Western blot analyses were performed according to standard procedures. Antibodies from Cell Signaling were used for detection of Pten (#9552), P-S473-Akt (#4058), P-T308-Akt (#9275), P-T24/T32-Foxo1/3 (#9464), P-S636/S639-

Irs1 (#2388), P-S240/S244-S6 ribosomal protein (#2215), and S6 ribosomal protein (#2217). For detection of total Akt1, we used an antibody from Upstate (#07-416), and for  $\beta$ -actin, from Sigma (AC-15).

**RNA analyses.** Total RNA from tissues or fibroblasts was extracted using TRIZOL (Invitrogen). Reverse transcription was performed using random primers and Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare). Quantitative real time-PCR was performed using DNA Master Sybr Green I mix (Applied Biosystems) in an ABI PRISM 7700 thermocycler (Applied Biosystem). Primer sequences are described in **Supp. Table 8**. The housekeeping gene used for input normalization of all the qRT-PCR data is  $\beta$ -actin.

**Histological analyses.** Brown adipose tissue, white adipose tissue and liver were fixed overnight in formalin, embedded in paraffin blocks and sectioned. Tissue sections were stained with hematoxylin/eosin. The size of white adipocytes was using ImageJ program and at least 500 cells were measured for each mouse.

**Statistical analyses.** Survival curves were compared using the logrank test. For all other comparisons we used, as indicated, the Fisher's exact test or the two-tailed Student's t-test. Cox regression and analyses of covariance (ANCOVA) using a general linear model (GLM) were performed with R software (<http://www.r-project.org/>).

52. Matheu, A., Klatt, P. & Serrano, M. Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* **280**, 42433-42441 (2005).
53. Matheu, A. *et al.* Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* **18**, 2736-2746 (2004).
54. Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* **9**, 203-209 (2009).
55. Mulero, F., Donate, L. E. & Serrano, M. Imaging cancer in mice by PET, CT, and combined PET-CT. *Curr Protoc Mouse Biol* **1**, 85-103 (2011).
56. Palmero, I. & Serrano, M. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* **333**, 247-256 (2001).
57. Greulich, H. *et al.* Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med* **2**, e313 (2005).
58. Lorenzo, M., Valverde, A. M., Teruel, T. & Benito, M. IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. *J Cell Biol* **123**, 1567-1575 (1993).

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. Generation and characterization of *Pten*<sup>tg</sup> mice.

- Relative *Pten* mRNA levels of the indicated tissues. Bars represent mean  $\pm$  sd (n=3 per genotype). Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test.
  - Immunoblot of the indicated proteins in growing cultures of primary MEFs. Each lane corresponds to an independent MEF preparation.
  - Lysates from normal growing (C), serum starved (-) or starved and stimulated with insulin (+) immunoblotted to detect the indicated proteins.
  - Neoplastic foci in MEFs retrovirally transduced with the viral oncoprotein E6 and either one of the indicated PI3K-dependent oncogenes, EGFR<sup>L858R</sup> or polyoma virus middle-T. Bars represent mean  $\pm$  sd (n=3 independent MEF preparations per genotype). Representative plates are shown in the top. Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test.
  - Chemical carcinogenesis with 3-methyl-cholanthrene (3MC). Tumour-free Kaplan-Meier curves. Time is post-3MC. Statistical significance was determined by the logrank test.
  - Incidence of cancers. *Left*, percentage of mice with 1 cancer, or more (2-4), as indicated. *Right*, percentage of mice with the indicated type of cancer. Statistical significance was determined by the Fisher's exact test.
- \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

### Figure 2. Extended survival and improved healthspan in *Pten*<sup>tg</sup>.

- Kaplan-Meier survival curves. Statistical significance was determined by the logrank test. Numbers in red indicate the relative increase in median survival.
  - Kaplan-Meier survival curves of those mice that were free of detectable cancer at the time of death. Statistical significance was determined by the logrank test.
  - DNA damage in the liver of old mice (1.5-2 years old; n=4 males per genotype). Percentage of positive nuclei by immunofluorescence using the indicated markers (mean  $\pm$  sd). Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test.
  - Insulin resistance measured as the HOMA-IR index determined from fasting insulin and glucose concentrations (see **Supp. Fig. 6**). Bars represent mean  $\pm$  sd (n=5-7 males per genotype and per age group; young: less than 6 months old; old: 1.5-2 years old). Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test.
  - Levels of phosphorylated Irs1 and Akt in epididymal WAT of old male mice (1.5-2 years old).
- \*p<0.05, \*\*p<0.01

### Figure 3. Elevated energy expenditure, decreased adiposity and protection from diet-induced steatosis in *Pten*<sup>tg</sup> mice.

- Weight curves (n=15 for each genotype and sex).
- Food intake in absolute values (*left*) and normalized by body weight (*right*) (n=8 males per genotype; 3-4 months old).

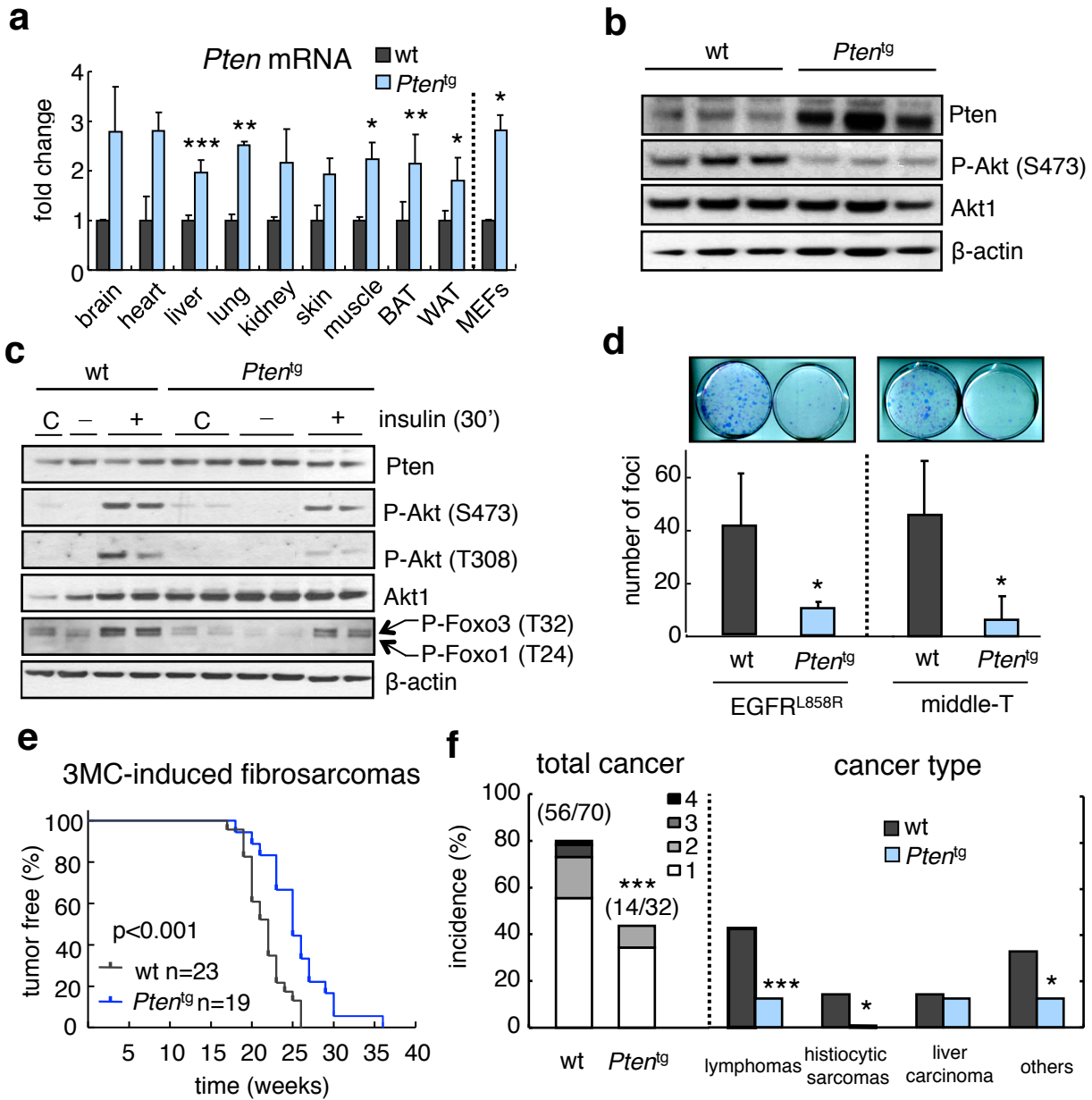
- c. Energy expenditure measured in adult males and females (6-8 moths old; n=8-10 per genotype and per sex). The bar graph at the right side represents the average Area Under the Curve (AUC) over the indicated 12 hr period.
- d. Resting metabolic rate measured at the indicated temperatures in adult males (6-8 moths old; n=7-9 per genotype).
- e. Adiposity in young mice (6-8 moths old; n=8-10 per genotype and per sex) measured by Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA). Values correspond to the percentage of fat relative to the sum of lean and fat masses.
- f. Representative picture of epididymal WAT. Samples correspond to young males and were stained with hematoxylin and eosin (bar indicates 100  $\mu$ m). Adipocyte area distribution is shown below (n=2 per genotype; >500 cells per genotype).
- g. Macroscopic views of representative livers 6 months after high-fat diet feeding and microscopic sections stained with hematoxylin and eosin (bar indicates 500  $\mu$ m).

All values correspond to mean  $\pm$  sd, and statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

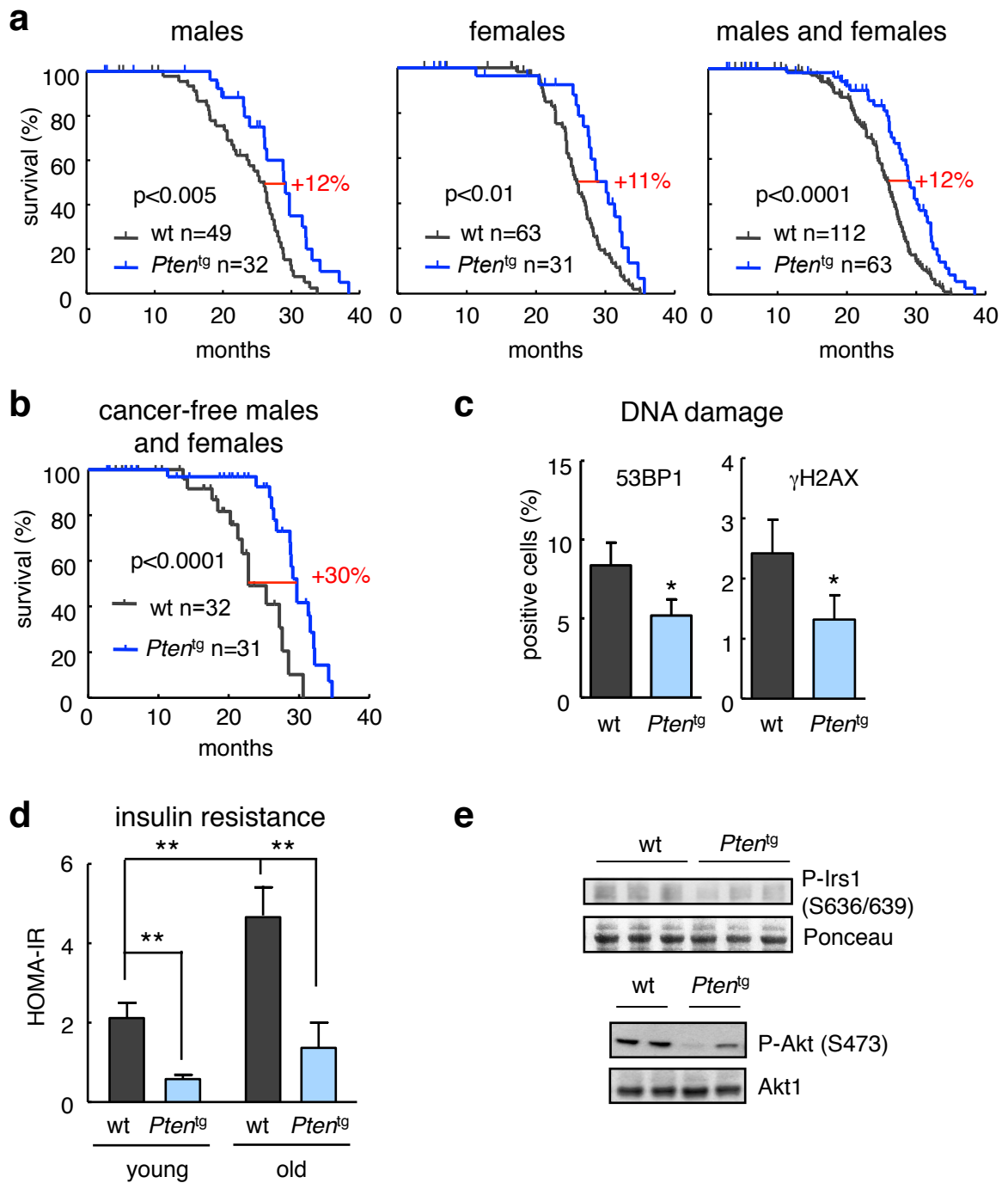
**Figure 4. Elevated uncoupling activity in *Pten*<sup>tg</sup> brown adipose tissue (BAT).**

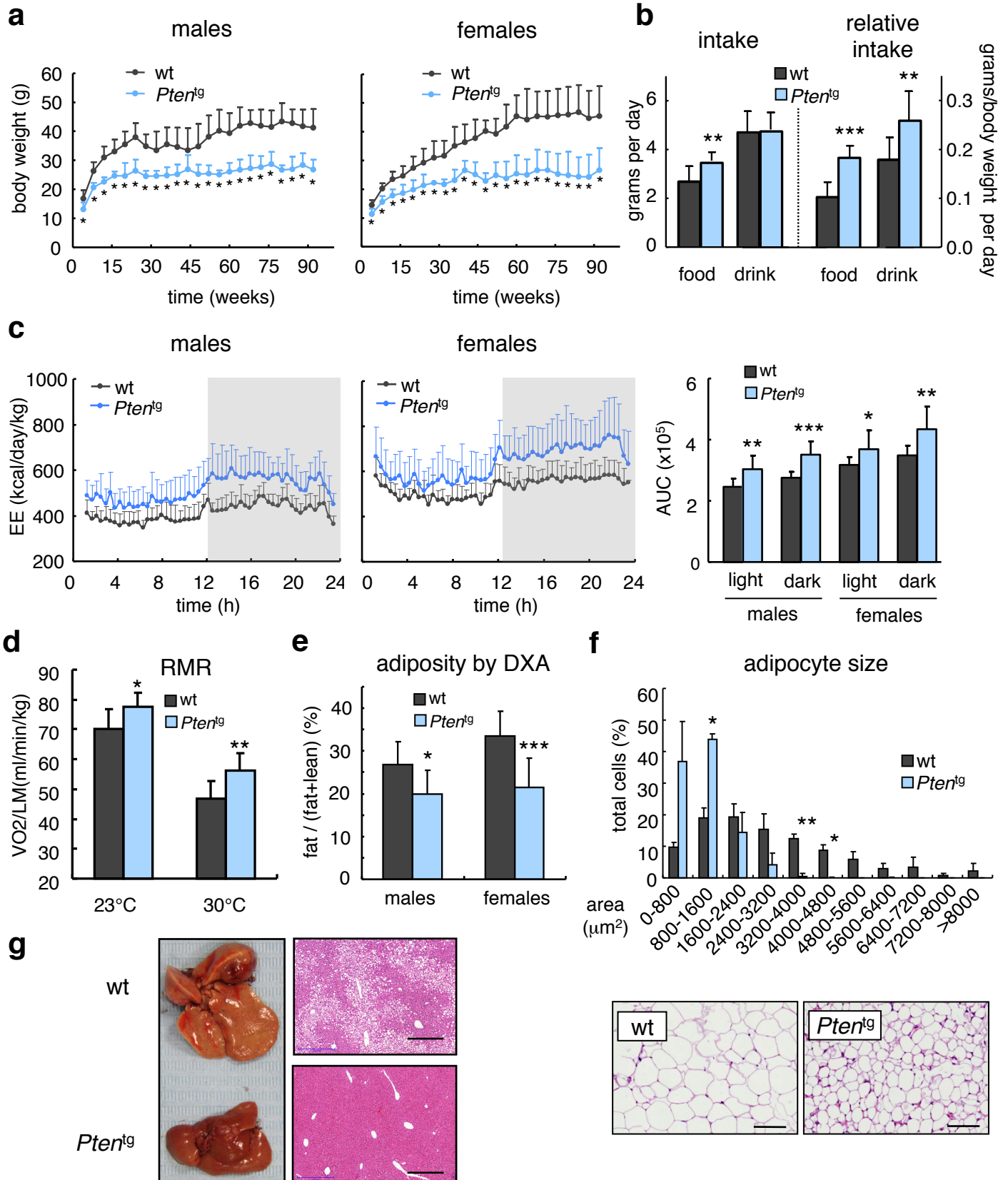
- a. Representative macroscopic pictures of brown adipose tissue (BAT) (*left*, bar indicates 1 cm). Microscopic pictures of BAT stained with hematoxylin and eosin (*right*, bars indicate 100  $\mu$ m). Samples correspond to males (5 months old).
- b. Glucose (FDG) uptake measure by PET. Representative pictures are in the left. Relevant organs are indicated in addition to BAT: bl, bladder; h, heart; br, brain. Analyses were done in males (6 months old; n=5 per genotype). Quantification of the average FDG uptake activity of the BAT is shown in the right panel.
- c. Relative gene expression in BAT (5 months old; n=3-6 males per genotype).
- d. Immunoblot of BAT lysates (5 months old; n=5 males per genotype).
- e. Relative mRNA levels in differentiated 3T3-L1/Cebp $\beta$  cells (n=3 independent biological repeats), immortalized neonatal pre-brown adipocytes (n=3 independent lines), and differentiated brown adipocytes (n=3 independent differentiation assays). Cells were treated with forskolin (10  $\mu$ M) and/or the PI3Ki "CNIO-compound A" (1  $\mu$ M in the case of 3T3-L1/Cebp $\beta$  cells and pre-brown adipocytes; 10  $\mu$ M in the case of differentiated brown adipocytes) and analyzed 4 hr later.
- f. Relative mRNA levels in BAT upon PI3Ki "CNIO-compound A" (15 mg per kg of body weight) or vehicle administration, by gavage (3 months old; n=3 males C57BL6 per group). Samples were analyzed 6 h after administration.
- g. Representative microscopic pictures of ectopic BAT derived from *Prdm16/Cebpb*-programmed wt or *Pten*<sup>tg</sup> fibroblasts. Low magnification, bars corresponds to 1 mm; high magnification, bars correspond to 200  $\mu$ m. Additional pictures are shown in **Supp. Fig. 26**.
- h. Amount of BAT formation by *Prdm16/Cebpb*-programmed wt or *Pten*<sup>tg</sup> fibroblasts. Each value corresponds to the area of BAT (in arbitrary units) measured in the fat pads formed per injection site (n=8 for wt, and n=7 for *Pten*<sup>tg</sup>).

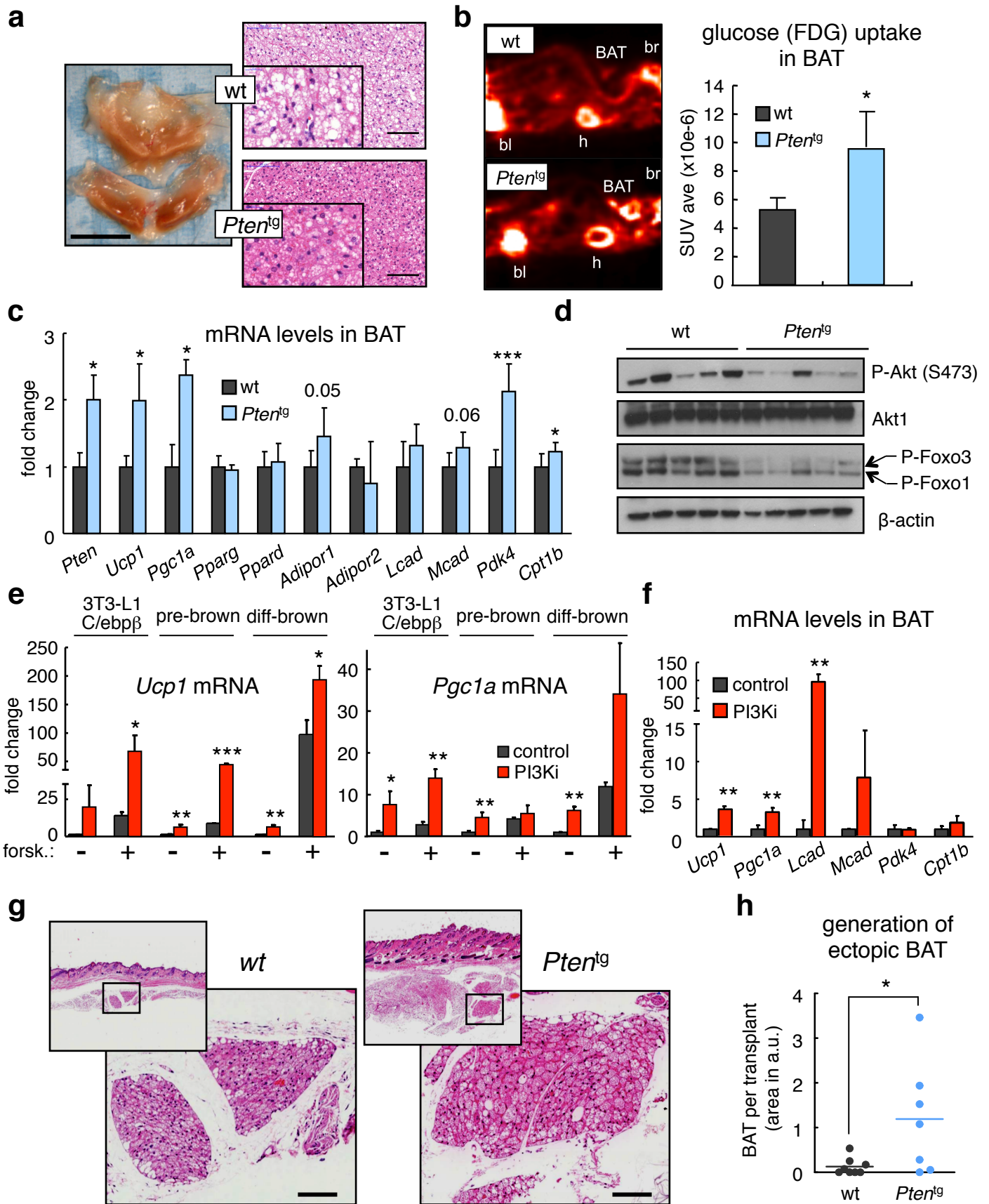
Values represent mean  $\pm$  sd, and statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

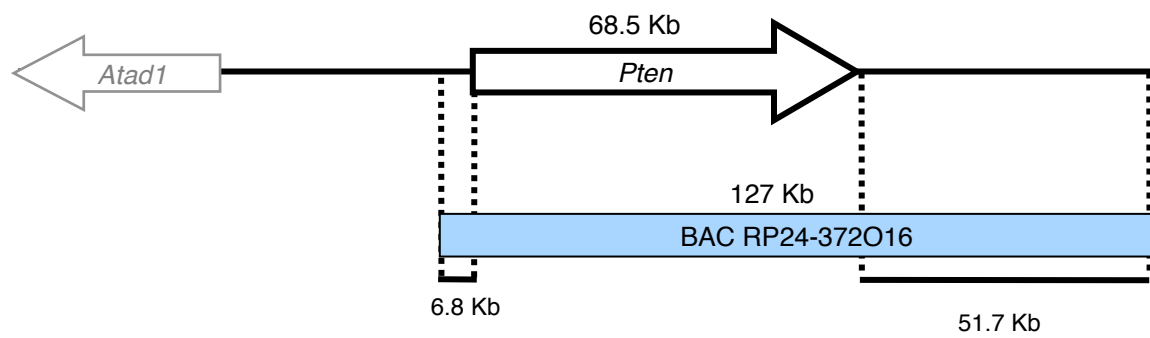




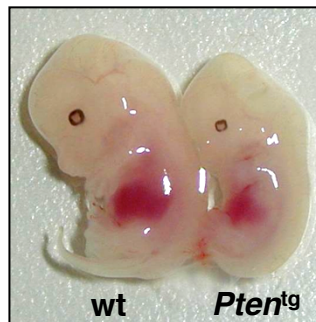




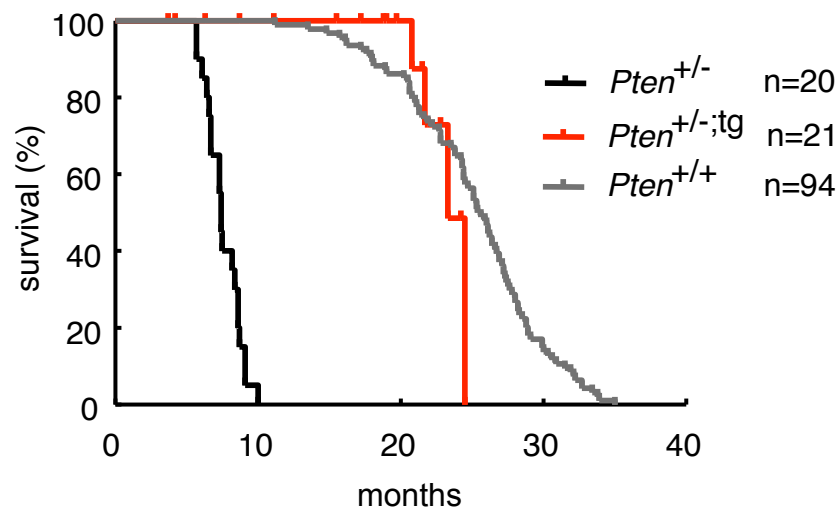




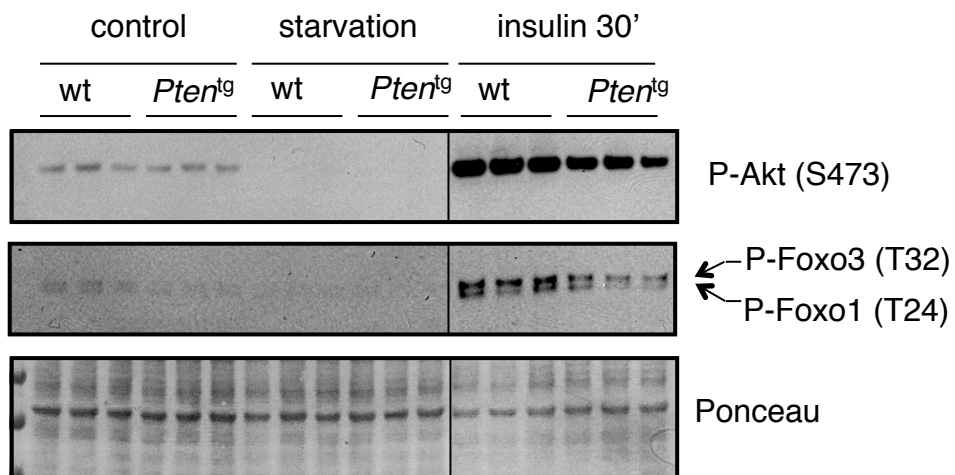
**Supplementary Figure 1.** Scheme of BAC used for the generation of *Pten*<sup>tg</sup> mouse.



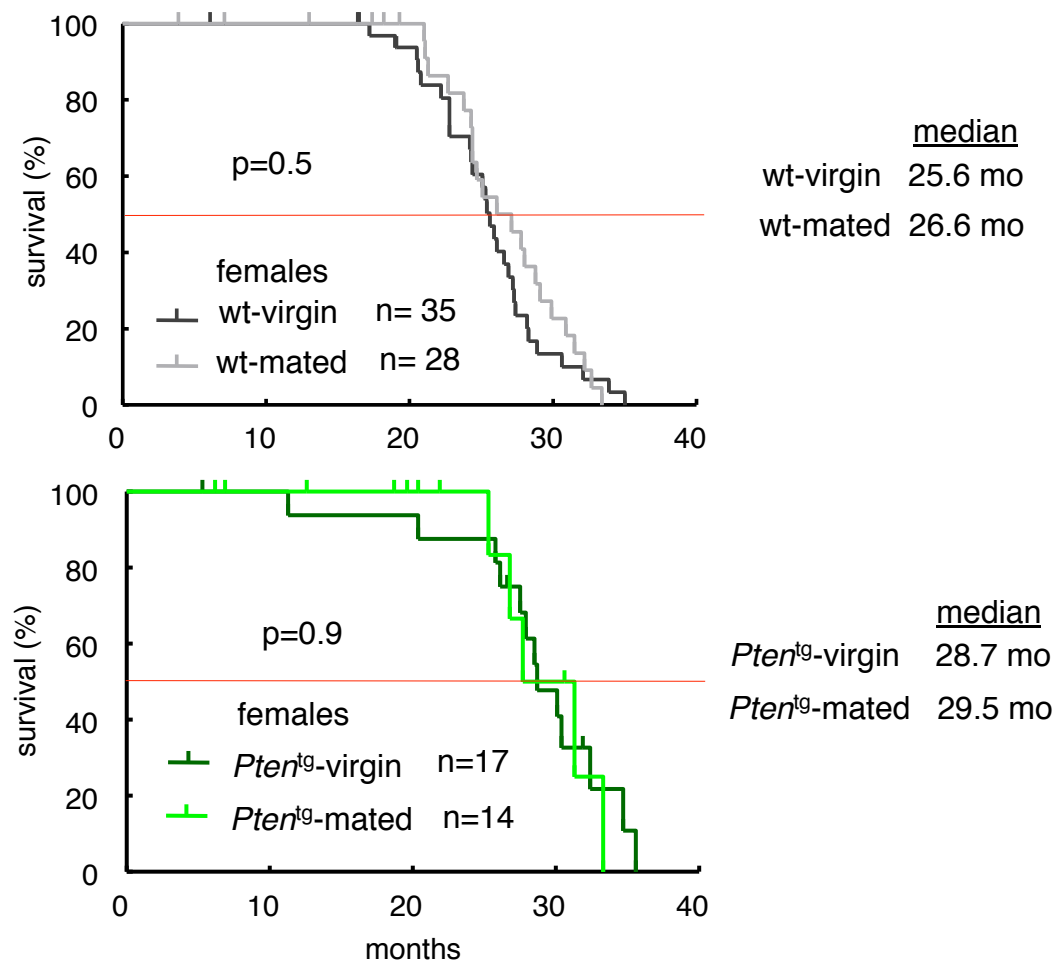
**Supplementary Figure 2.** Representative picture of E13.5 embryos of the indicated genotypes.



**Supplementary Figure 3.** Rescue to the early lethality of *Pten*<sup>+/-</sup> mice by the transgenic copy of *Pten*. Kaplan-Meier curves of the indicated cohorts (males and females pooled).



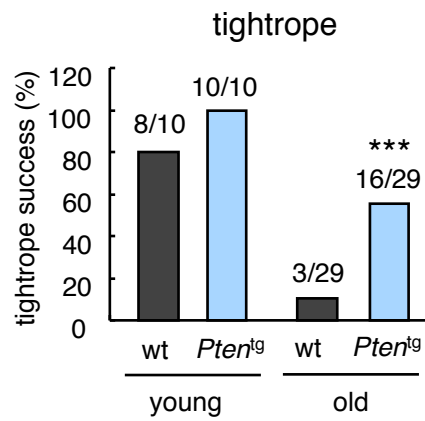
**Supplementary Figure 4.** Immunoblot of lysates from normal growing cells (control), serum deprived cells (starvation), or starved and then stimulated cells with 1  $\mu$ g/ml insulin (insulin 30'). Ponceau staining is shown as a loading control.



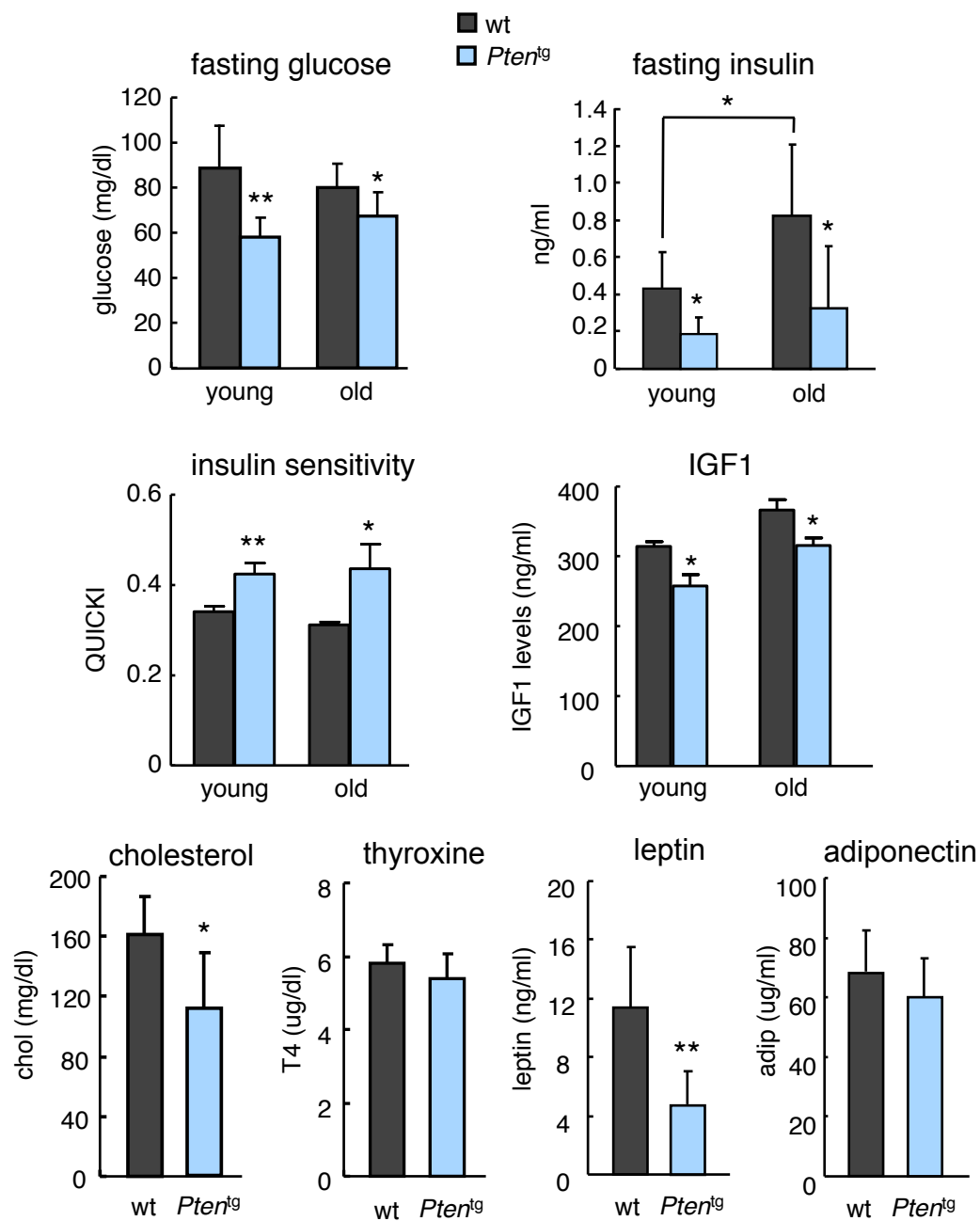
Univariate Cox Analysis (females, n=94)

|          | B      | SE    | Wald  | df | sig.         | exp(B) | 95% IC for exp(B) |       |
|----------|--------|-------|-------|----|--------------|--------|-------------------|-------|
|          |        |       |       |    |              |        | low               | high  |
| Mated    | 0.004  | 0.251 | 0.000 | 1  | 0.986        | 0.996  | 0.608             | 1.629 |
| Genotype | -0.755 | 0.282 | 7.184 | 1  | <b>0.007</b> | 0.470  | 0.271             | 0.816 |

**Supplementary Figure 5.** Survival curves for virgin and mated wt females (top panel) and for virgin and mated *Pten*<sup>tg</sup> females (middle panel). Log-rank tests indicate that there are no significant differences in survival associated to the reproductive history. The table (bottom panel) shows a Cox regression analysis that indicates that survival is significantly associated to genotype, but not to the reproductive history (mated or virgin).

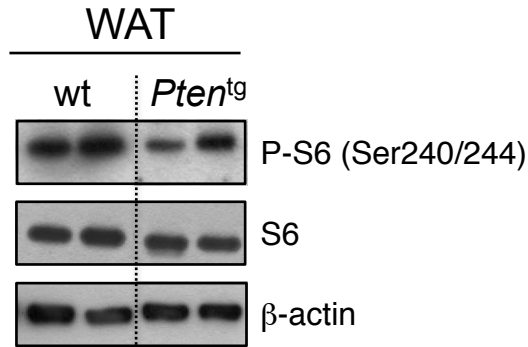


**Supplementary Figure 6.** Neuromuscular coordination. Tightrope assay in young (< 6 month) and old (1.5-2 years) mice (mixed sexes) of the indicated genotypes (number of mice that passed the test vs. total number of tested mice). Mice were placed on a bar of circular section (60 cm long and 1.5 cm diameter) and the test was considered successful when a mouse stayed on the bar for 60 seconds in a least one trial out of 5 consecutive trials. Statistical significance was determined by the Fisher's exact test.

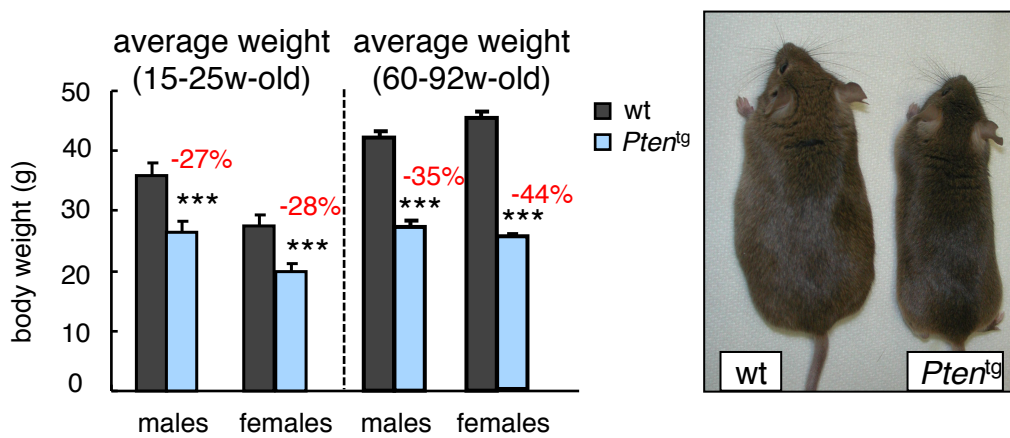


**Supplementary Figure 7.** Levels of the indicated metabolites and hormones in serum. QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index. Young corresponds to 4-8 months old, and old corresponds to 1.5-2 years old. Values correspond to the mean ± sd (n=5-8). Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

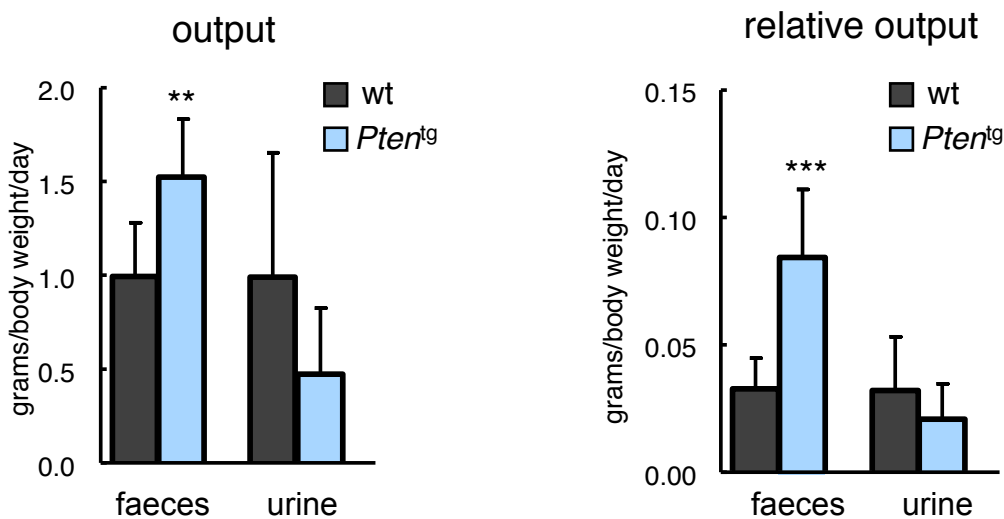




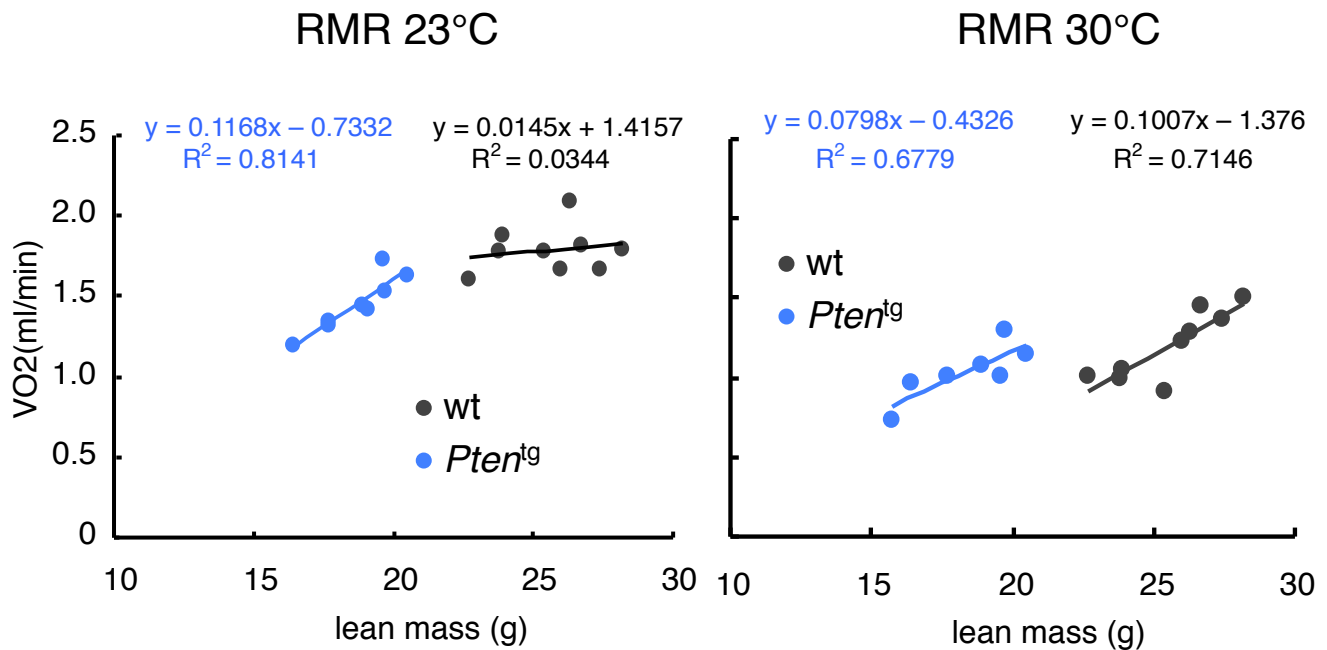
**Supplementary Figure 8.** Immunoblot of the indicated proteins from WAT extracts (n=2 males per genotype; 4 months old).



**Supplementary Figure 9.** Body weight at the indicated age ranges. Representative picture of wt and *Pten*<sup>tg</sup> mice (6 months old). Values correspond to the mean  $\pm$  sd (n=15 per genotype and sex). Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*\*\*p<0.001.



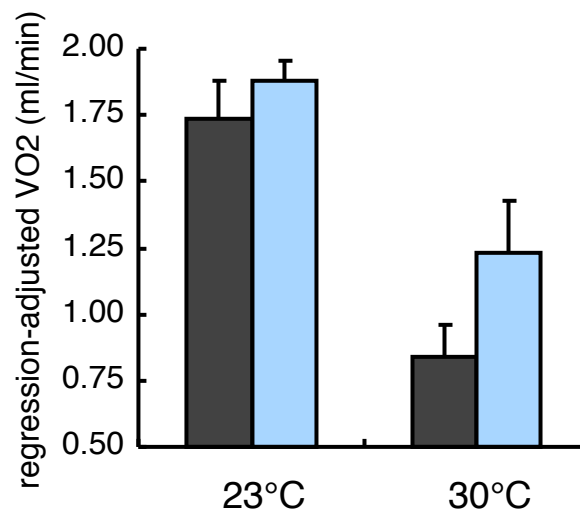
**Supplementary Figure 10.** Output in absolute values (*left*) and normalized by body weight (*right*) (n=8 males per genotype; 3-4 months old).



|                           | genotype*LM<br>interaction<br>( <i>p</i> value) | ANCOVA<br>Genotype<br>( <i>p</i> value) | ANCOVA<br>LM<br>( <i>p</i> value) | t-test<br>regression-<br>adjusted RMRs<br>( <i>p</i> value) |
|---------------------------|---|---|-----------------------------------|---|
| <b>RMR<sub>23°C</sub></b> | <b>0.030</b>                                    | n.a.                                    | n.a.                              | <b>0.025</b>  |
| <b>RMR<sub>30°C</sub></b> | 0.560   | <b>3.0e-03</b>                          | <b>2.5e-04</b>                    | n.a.  |

n.a.: not applicable

### regression-adjusted RMR <sup>a</sup>



<sup>a</sup> for the statistical analyses see table and figure legend

**Supplementary Figure 11.** Statistical analysis by General Linear Model (GLM) of the Resting Metabolic Rate (RMR).

The upper graphs show the RMR data at the indicated temperatures in male mice of wt or tg genotype. The adjusted regression lines for each group are also shown. The following mice were measured:  $n_{23^{\circ}\text{C-wt}}=9$ ;  $n_{23^{\circ}\text{C-tg}}=8$ ;  $n_{30^{\circ}\text{C-wt}}=9$ ;  $n_{30^{\circ}\text{C-tg}}=7$ .

Normal distribution of every variable was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test, and variance equality around the regression line of each group was confirmed using the F-test. GLM was employed to model RMR (dependent variable) as a function of genotype (factor: wt=0, tg=1) and lean mass (LM) (covariate). Application of GLM indicated that there was a significant interaction between RMR<sub>23°C</sub> and LM (see second column of the table above, *i.e.* the slopes of the wt and tg regression lines are significantly different) and absence of significant interaction between RMR<sub>30°C</sub> and LM (see table and similar slopes).

# In the case of RMR<sub>30°C</sub>, its GLM equation is:

$$\text{RMR}_{30^{\circ}\text{C}} = -1.14789 + 0.49410 (\text{Genotype}(0,1)) + 0.09181 (\text{LM})$$
$$R^2: 0.746.$$

Analysis of covariance (ANCOVA) indicated that RMR<sub>30°C</sub> is significantly affected by genotype (third column of the table) and LM (fourth column).

# In the case of RMR<sub>23°C</sub>, its GLM equation is:

$$\text{RMR}_{23^{\circ}\text{C}} = 1.41568 - 2.149(\text{Genotype}(0,1)) + 0.01450 (\text{LM}) + 0.10231(\text{Genotype}(0,1)*\text{LM})$$
$$R^2: 0.7701.$$

which can be re-written as follows:

$$\text{RMR}_{23^{\circ}\text{C-wt}} = 1.41568 + 0.01450 (\text{LM}); R^2: 0.034.$$

$$\text{RMR}_{23^{\circ}\text{C-tg}} = (1.41568 - 2.149) + (0.01450+0.1) (\text{LM}); R^2: 0.81.$$

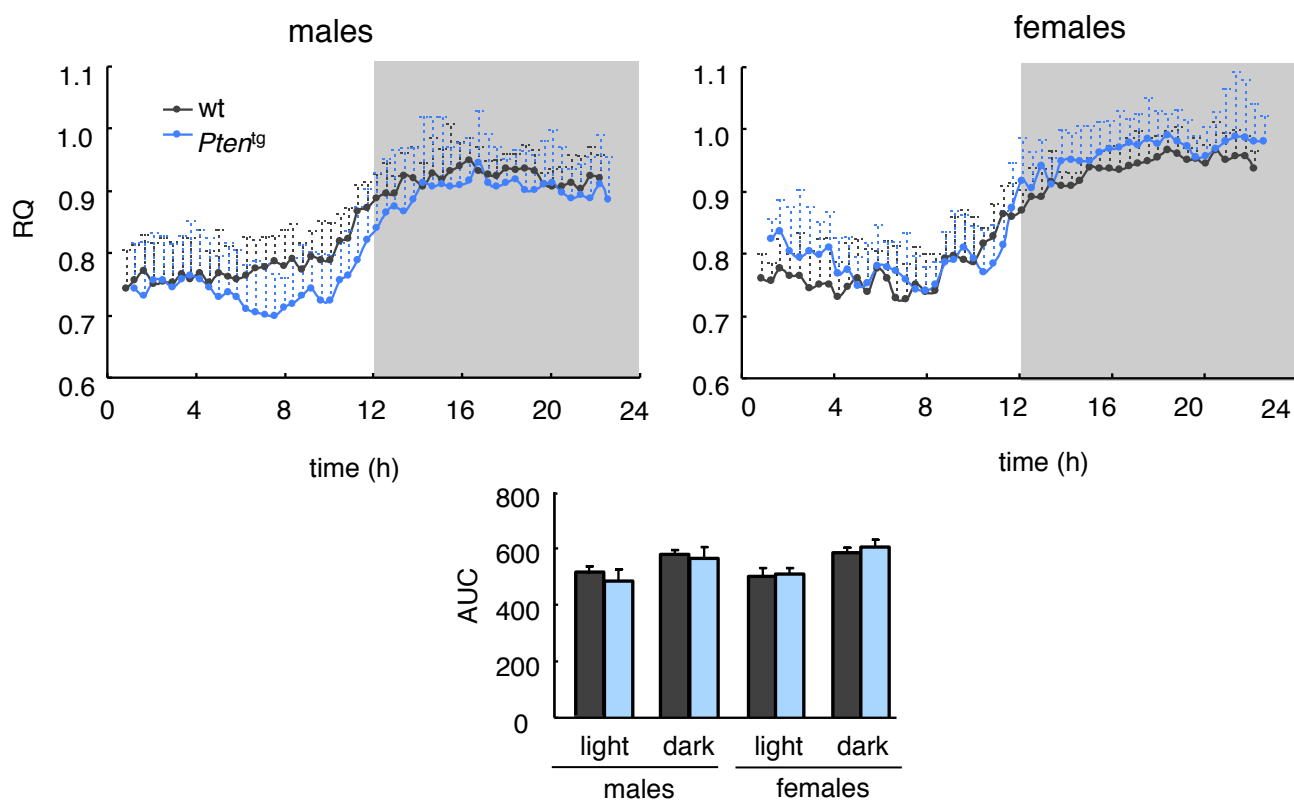
The interaction between LM and genotype means that there is evidence that intercept and slopes are different between groups. Thus, we followed the procedure previously recommended elsewhere (Arch *et al.* Int. J. Obes., 30, 1322-1331: 2006), *i.e.* to use the regression line of each group to predict what the RMR would be for each animal in that group if it had had the average LM for the two groups combined. Specifically:

$$\text{RMR}_{\text{adj\_wt}} = \text{RMR}_{\text{observed\_wt}} - (\text{LMslopes}_{\text{wt}}(\text{LM}_{\text{observed\_wt}} - \text{LM}_{\text{mean\_wt+tg}}))$$

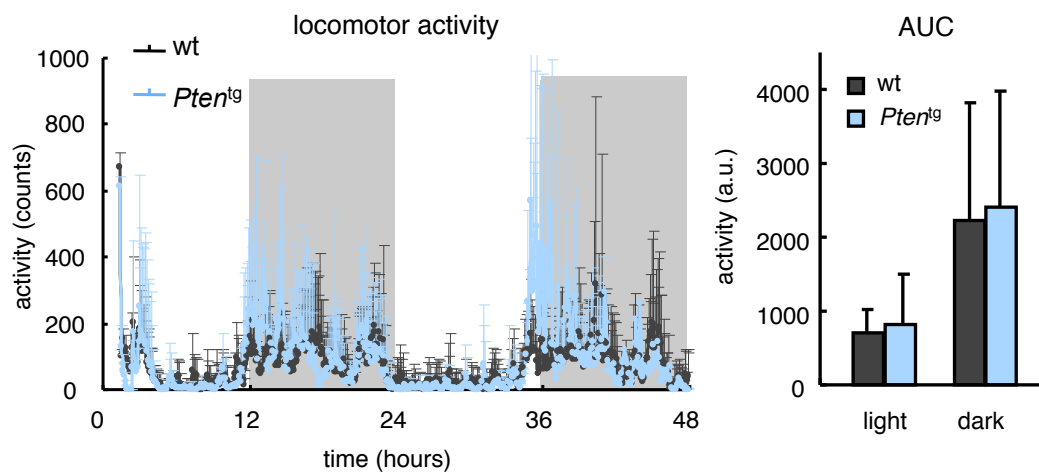
$$\text{RMR}_{\text{adj\_tg}} = \text{RMR}_{\text{observed\_tg}} - (\text{LMslopes}_{\text{tg}}(\text{LM}_{\text{observed\_tg}} - \text{LM}_{\text{mean\_wt+tg}}))$$

The resulting regression-adjusted RMR data were compared using the t-test (fifth column).

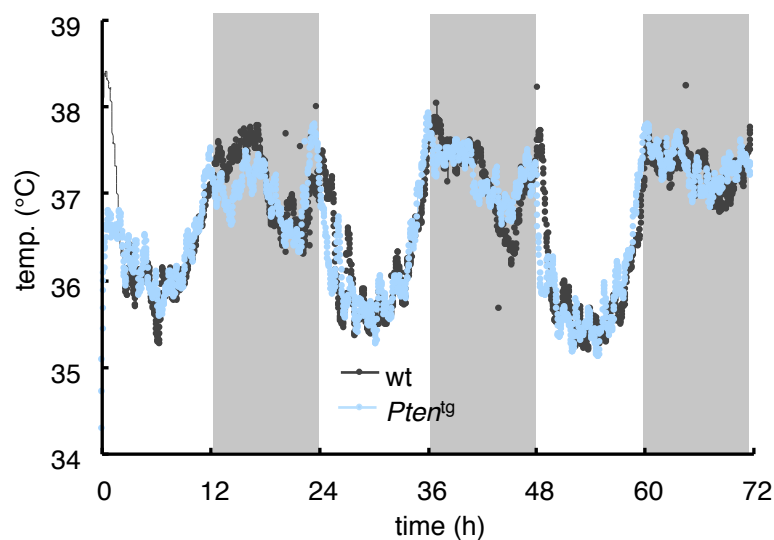
Finally, the lower graph shows the regression-adjusted RMR (using the above procedure for both RMR<sub>23°C</sub> and RMR<sub>30°C</sub>) to show that *Pten*<sup>tg</sup> mice have an increased RMR at both temperatures.



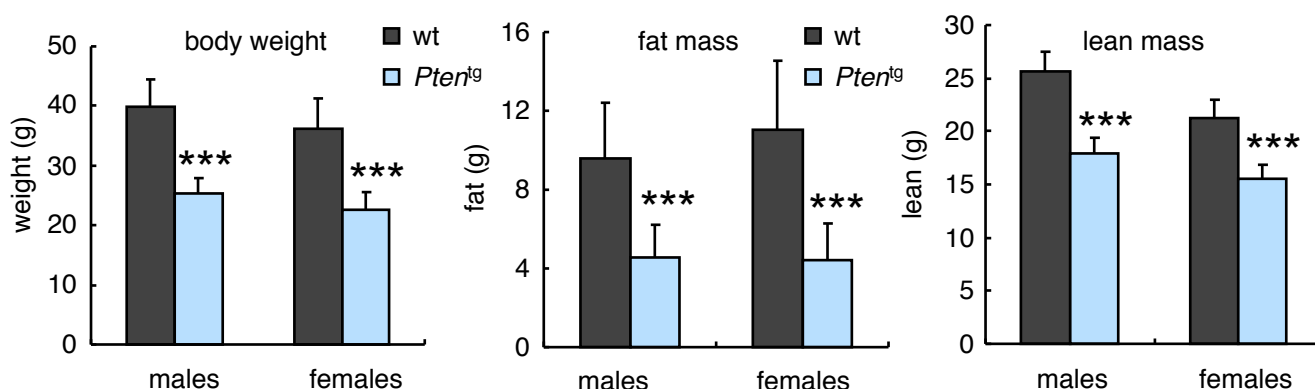
**Supplementary Figure 12.** Respiratory quotient ( $VCO_2/VO_2$ ) measured in adult males and females (6-8 months old;  $n=8-10$  per genotype and per sex). The bar graph represents the average Area Under the Curve (AUC) over the indicated 12 hr period.



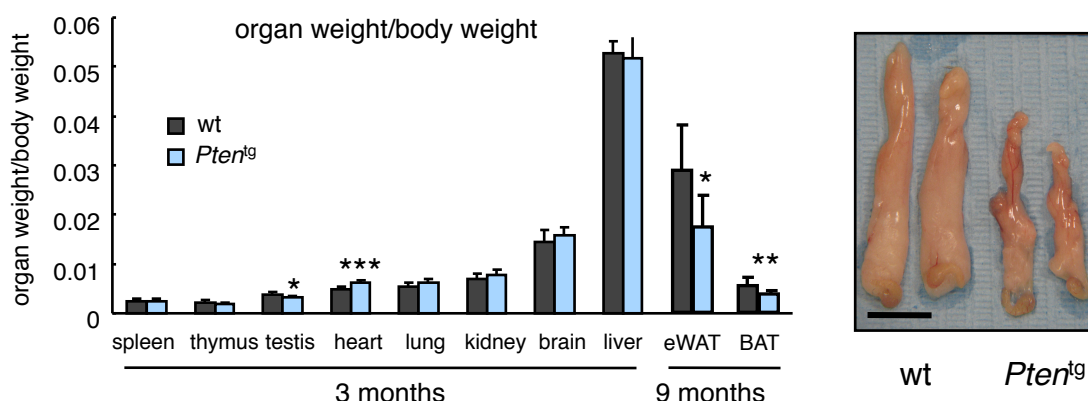
**Supplementary Figure 13.** Locomotor activity in wt and *Pten*<sup>tg</sup> mice. The adjacent bar graph represents the average area under the curve (AUC) over the two nocturnal and two diurnal phases. Values correspond to the mean  $\pm$  sd (n=8 males per genotype; 3 months old). Total locomotor activity was measured using the Physiocage System (Panlab Harvard Apparatus).



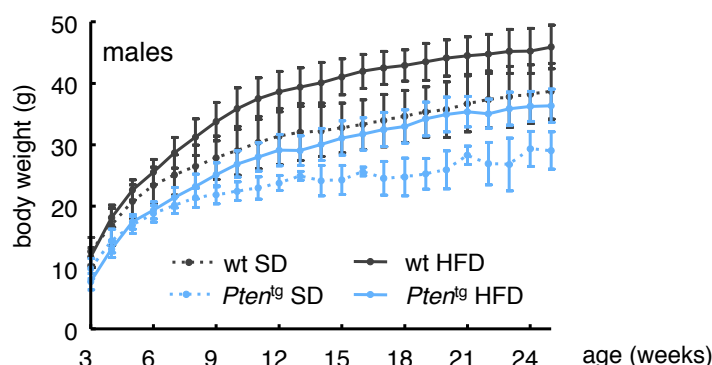
**Supplementary Figure 14.** Temperature in wt and *Pten*<sup>tg</sup> mice. For measuring temperature, mice were implanted intraperitoneally with a PhysioTel®TA-F10 transmitter (Data Sciences International, DSI) and temperature was recorded every 2 min at a room temperature of 23 degrees. Values correspond to the mean (n=6 males per genotype; 6 months old).



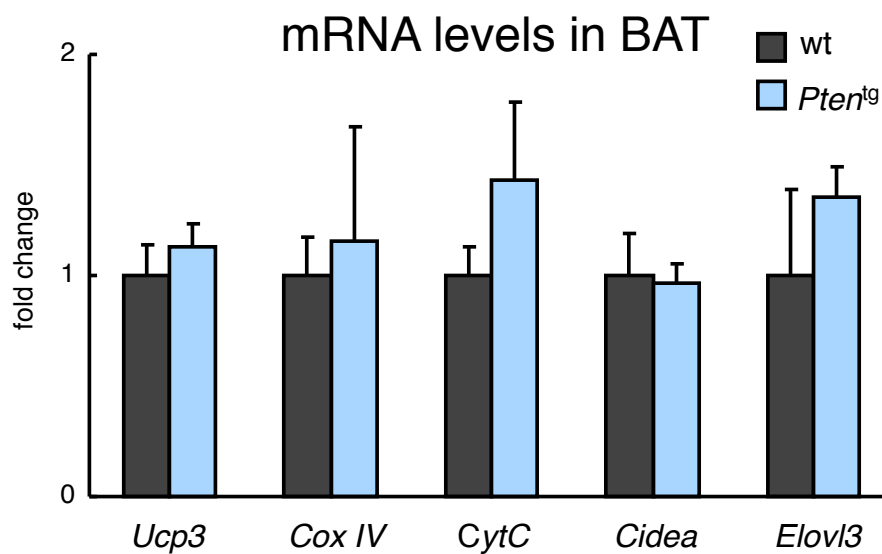
**Supplementary Figure 15.** Body weight, fat mass (measured by DXA), and lean mass (measured by DXA). Values represented correspond to the mean  $\pm$  sd (n=8-10 mice per genotype and sex; 6-8 months old). Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*\*\*p<0.001. Main Figure 3d shows the ratio between (fat mass) / (fat mass + lean mass).



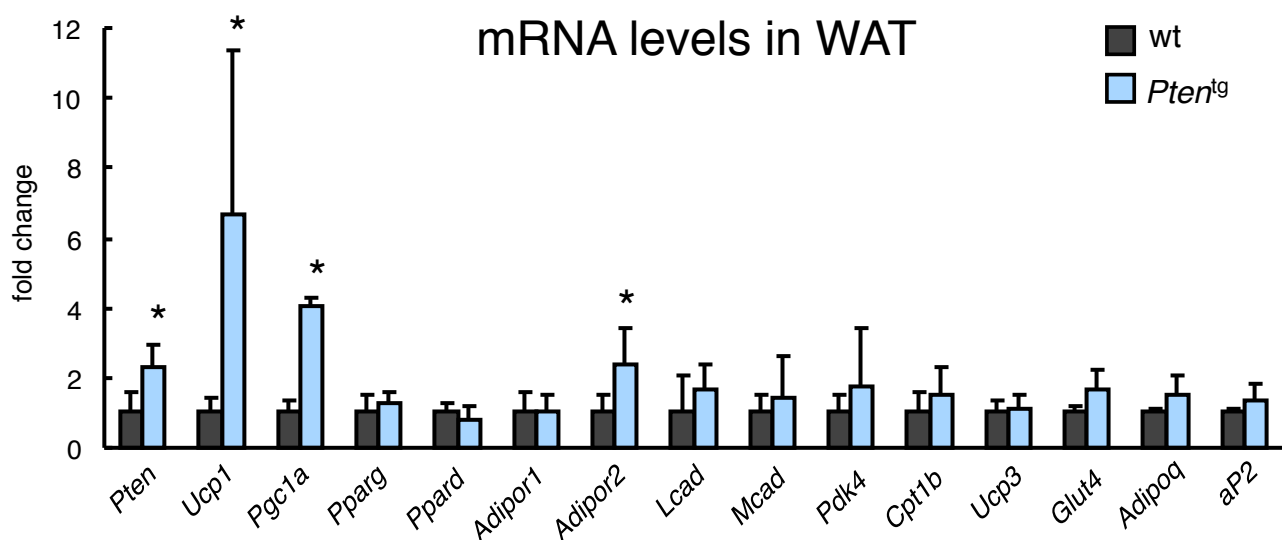
**Supplementary Figure 16.** Ratios between organ weight and total body weight (n=6-8 male mice per genotype). eWAT: epididymal WAT. Values correspond to the mean  $\pm$  sd. Statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. A representative macroscopic picture of the epididymal WAT is shown at the right side. Bar indicates 1 cm.



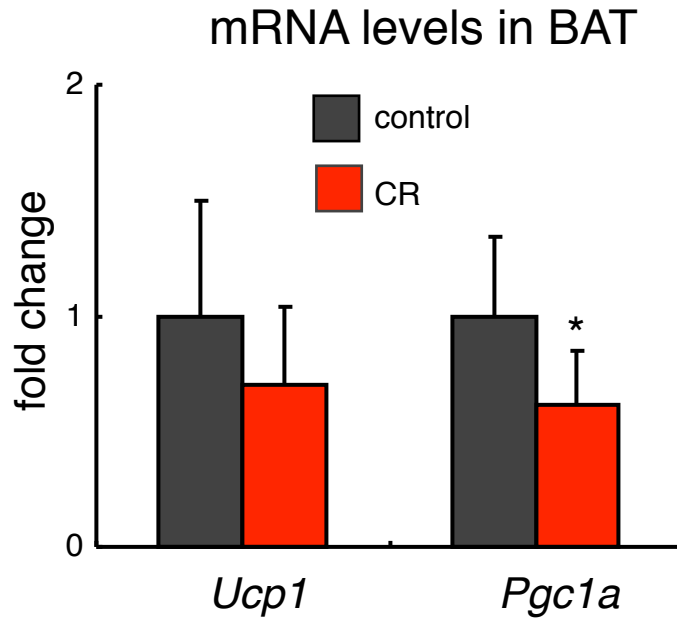
**Supplementary Figure 17.** Weight curves of male mice under Standard Diet (SD) (18% calories from fat) or High-Fat Diet (HFD) (45% calories from fat) since weaning (n=15 for each genotype). Values represent the mean  $\pm$  sd.



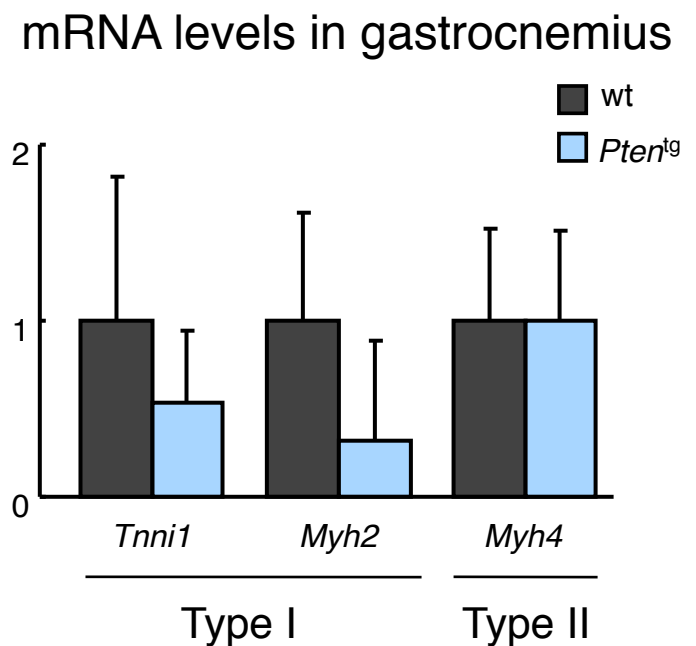
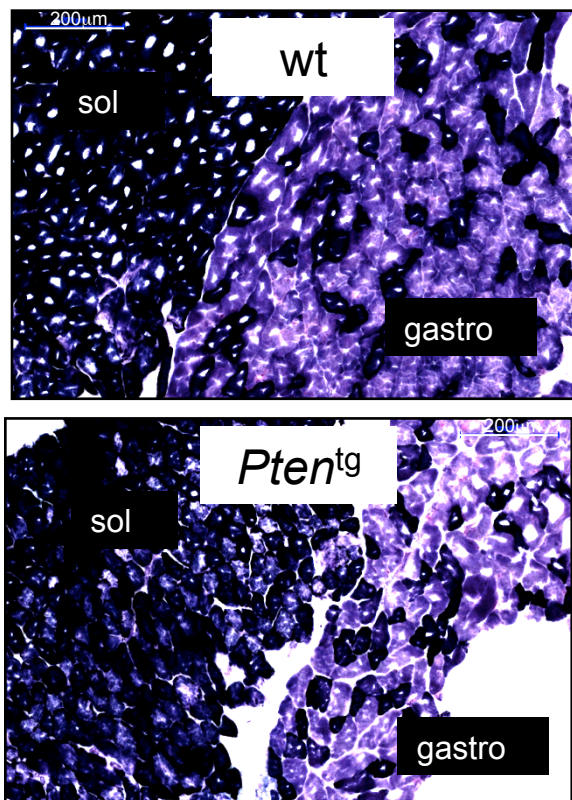
**Supplementary Figure 18.** Relative gene expression in BAT (4-5 months old; n=3-4 males per genotype). Values represent mean  $\pm$  sd. No changes were significant according the two-tailed Student's t-test.



**Supplementary Figure 19.** Relative gene expression in epididymal WAT (4-5 months old; n=3-6 males per genotype). Values represent mean  $\pm$  sd, and statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*p<0.05.

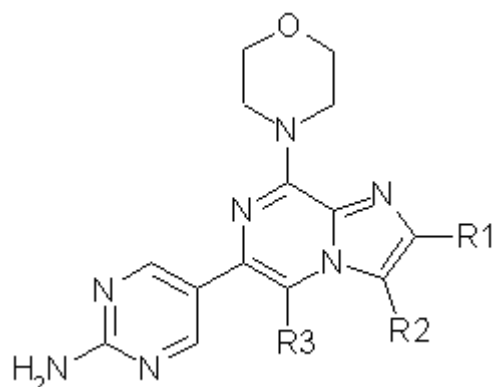


**Supplementary Figure 20.** Relative gene expression in BAT of mice under *ad libitum* diet (control) or under caloric restriction (CR) during 4 weeks (n=8 males per diet). CR was 25% caloric restriction (diet Bio-Serv F05312). Values represent mean  $\pm$  sd, and statistical significance was determined by the two-tailed Student's t-test. \*p<0.05.

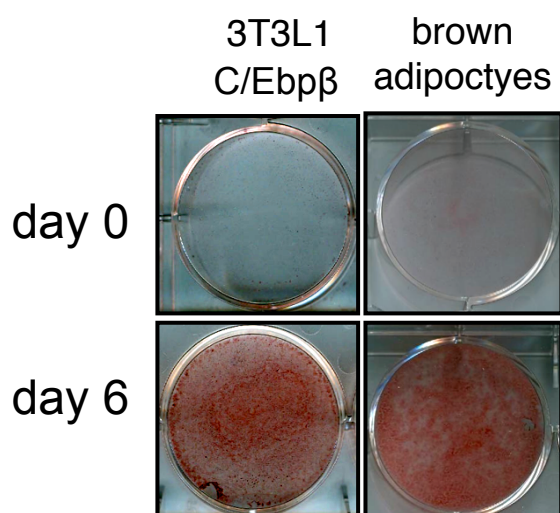


**Supplementary Figure 21.** Representative succinate dehydrogenase (SDH) histochemical staining on gastrocnemius (gastro) and soleus (sol) muscle sections. SDH-positive myofibers correspond to Type I. Relative gene expression of markers of Type I and Type II myofibers in gastrocnemius. Data correspond to n=4 males per genotype, 1.5-2 years old.

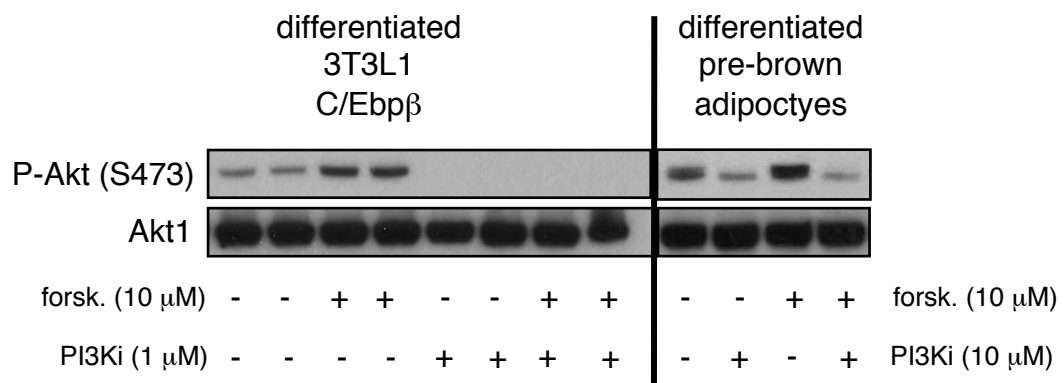




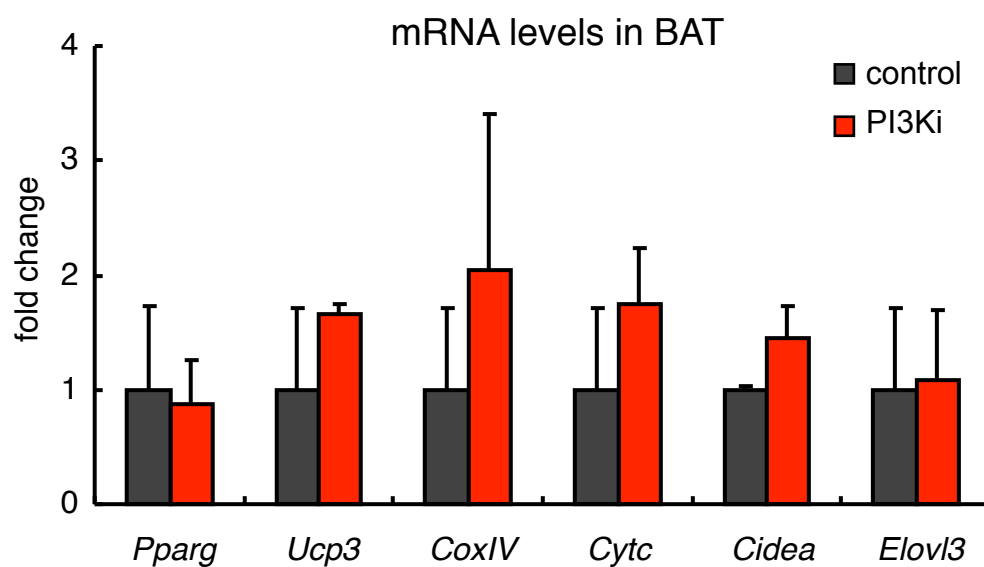
**Supplementary Figure 22.** General structure of the PI3K small compound inhibitor “CNIO-compound A”. The properties of this compound are reported in patent WO2010/119264 (freely accessible at the World Intellectual Property Organization, <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2010119264>).



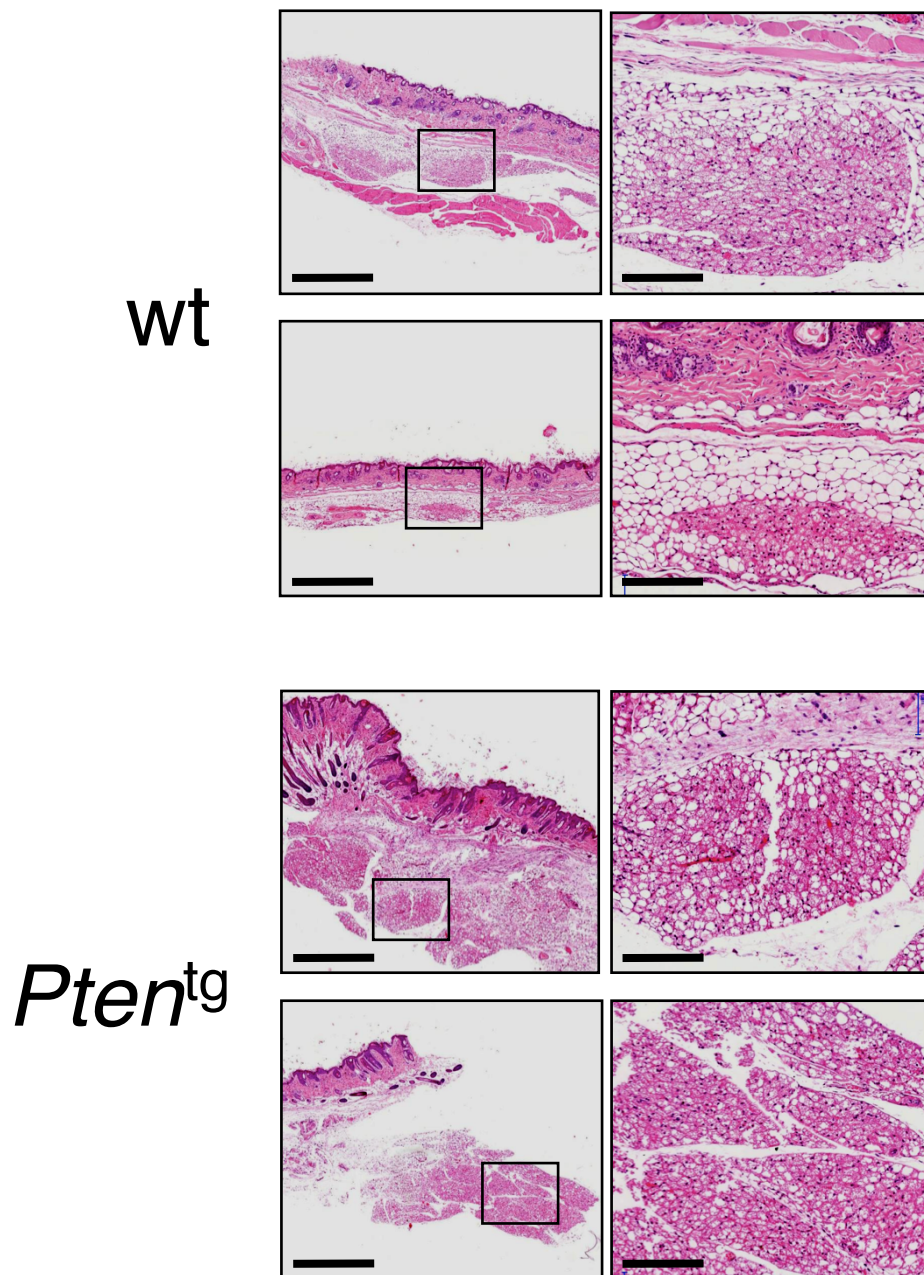
**Supplementary Figure 23.** Red-O staining of plates to demonstrate efficient adipocytic differentiation of the indicated cell types.



**Supplementary Figure 24.** Treatment of the indicated brown adipocyte cells with PI3Ki in the presence or absence of forskolin. Extracts were analyzed by immunoblot 4 hr after addition of the compounds.



**Supplementary Figure 25.** Relative gene expression in BAT of mice treated with “CNIO-compound A” (15 mg per kg of body weight) by gavage (3 months old; n=3 males C57BL6 per group). Samples were analyzed 6 h after administration.



**Supplementary Figure 26.** Representative examples of ectopic BAT from *Prdm16/Cebpb*-programmed wt or *Pten*<sup>tg</sup> fibroblasts. Low magnification, bars corresponds to 1 mm; high magnification, bars correspond to 200 μm.

**Supplementary Table 1.** Perinatal lethality of *Pten*<sup>tg</sup> mice

|                                 | crosses: <i>Pten</i> <sup>+/+</sup> x <i>Pten</i> <sup>+/+;tg/+</sup> |          |               |          |
|---------------------------------|---|----------|---------------|----------|
|                                 | E13.5 embryos   |          | weaned mice   |          |
|                                 | observed (n)  | expected | observed (n)  | expected |
| <i>Pten</i> <sup>+/+</sup>      | 55% (42)  | 50%      | 72% (409)     | 50%      |
| <i>Pten</i> <sup>+/+;tg/+</sup> | 45% (35)  | 50%      | 28% (162)     | 50%      |
| Fishers test                    | $p = 0.1$   |          | $p = 0.00001$ |          |

**Supplementary Table 2.** Complete registry of the cohorts

| COHORT OF WT MICE (n=112) |     |               |               |                   |                       |      |                            |                         |  |
|---------------------------|-----|---------------|---------------|-------------------|-----------------------|------|----------------------------|-------------------------|--|
| ID                        | sex | date of birth | date of death | date of censoring | endpoint <sup>a</sup> | age  | females mated <sup>b</sup> | probable cause of death | other pathologies  |
| ID#006                    | M   | 30/05/2007    | 25/12/2008    |                   | HEP                   | 18.9 |                            | lymphoma                | glomerulosclerosis   |
| ID#007                    | F   | 30/05/2007    | 30/07/2009    |                   | HEP                   | 26.1 | yes                        | lymphoma                | endometrial cystic hyperplasia   |
| ID#018                    | F   | 20/06/2007    | 22/03/2009    |                   | HEP                   | 21.1 | yes                        | histiocytic sarcoma     | hepatosteatosi and hepatitis   |
| ID#035                    | M   | 02/08/2007    | 12/10/2009    |                   | HEP                   | 26.4 |                            | histiocytic sarcoma     | testicular atrophy   |
| ID#036                    | M   | 02/08/2007    | 30/09/2009    |                   | HEP                   | 26.0 |                            | liver carcinoma         | pancreatitis   |
| ID#037                    | M   | 02/08/2007    | 03/09/2009    |                   | HEP                   | 25.1 |                            | lung carcinoma          | thyroid adenoma, liver adenoma, hepatosteatosi                           |
| ID#049                    | M   | 25/08/2007    | 12/05/2009    |                   | HEP                   | 20.6 |                            | liver carcinoma         | hepatosteatosi, thyroid hyperplasia, nephropathy, testicular atrophy     |
| ID#050                    | M   | 25/08/2007    | 12/05/2009    |                   | HEP                   | 20.6 |                            | liver carcinoma         | low grade PIN, thyroid hyperplasia, nephropathy, pancreatitis            |
| ID#055                    | F   | 25/08/2007    |               | 23/09/2008        | HEP                   | 13.0 | yes                        |                         | dermatitis   |
| ID#056                    | F   | 25/08/2007    | 26/10/2009    |                   | DIC                   | 26.1 | no                         | n.d                     |  |
| ID#057                    | M   | 29/08/2007    | 23/06/2010    |                   | HEP                   | 33.8 |                            | lymphoma                | low grade PIN, testicular atrophy  |
| ID#058                    | M   | 29/08/2007    | 24/02/2009    |                   | DIC                   | 17.9 |                            | n.d                     |  |
| ID#059                    | M   | 29/08/2007    | 25/04/2010    |                   | HEP                   | 31.9 |                            | lymphoma                | thyroid adenoma, lung adenoma, liver carcinoma, hemangioma, pancreatitis |
| ID#062                    | M   | 11/09/2007    | 02/02/2010    |                   | HEP                   | 28.8 |                            | lymphoma                | low grade PIN, glomerulosclerosis, hepatitis                             |
| ID#063                    | M   | 11/09/2007    |               | 26/11/2009        | HEP                   | 26.5 |                            |                         | dermatitis   |
| ID#065                    | M   | 11/09/2007    | 10/01/2010    |                   | HEP                   | 28.0 |                            | histiocytic sarcoma     | testicular atrophy   |

|        |   |            |            |            |     |      |     |                           |  |
|--------|---|------------|------------|------------|-----|------|-----|---------------------------|--|
| ID#068 | F | 11/09/2007 | 28/03/2010 |            | HEP | 30.6 | no  | sepsis                    | thyroid hyperplasia  |
| ID#070 | M | 23/09/2007 | 14/12/2008 |            | DIC | 14.8 |     | n.d                       |  |
| ID#071 | M | 23/09/2007 |            | 08/09/2009 | HEP | 23.6 |     |                           | dermatitis   |
| ID#073 | F | 23/09/2007 | 16/02/2010 |            | HEP | 28.8 | yes | lymphoma                  | thyroid hyperplasia  |
| ID#074 | F | 23/09/2007 | 14/06/2010 |            | HEP | 32.7 | yes | n.d                       |  |
| ID#076 | F | 01/10/2007 | 27/07/2010 |            | HEP | 33.9 | no  | lymphoma                  |  |
| ID#077 | F | 01/10/2007 | 10/01/2010 |            | HEP | 27.4 | no  | lymphoma                  | liver adenoma,<br>lung carcinoma,<br>thyroid<br>hyperplasia,<br>pancreatitis   |
| ID#080 | F | 01/10/2007 | 29/04/2009 |            | HEP | 19.0 | no  | lung carcinoma            | Harderian gland<br>carcinoma, liver<br>carcinoma, thyroid<br>adenoma,<br>nephropathy,<br>cystic endometrial<br>hyperplasia |
| ID#081 | F | 01/10/2007 | 25/08/2009 |            | HEP | 22.8 | no  | corneal ulcer             | thyroid adenoma  |
| ID#082 | M | 14/10/2007 | 26/01/2010 |            | HEP | 27.5 |     | renal failure             | lung carcinoma,<br>liver carcinoma,<br>pulmonary edema,<br>pancreatitis  |
| ID#084 | F | 14/10/2007 | 19/10/2009 |            | DIC | 24.2 | no  | n.d                       |  |
| ID#085 | F | 14/10/2007 | 23/07/2009 |            | HEP | 21.3 | yes | cardiovascular<br>failure | thyroid adenoma,<br>pancreatitis   |
| ID#088 | M | 16/10/2007 | 02/02/2010 |            | HEP | 27.6 |     | cardiovascular<br>failure | thyroid adenoma  |
| ID#090 | F | 16/10/2007 | 27/07/2010 |            | HEP | 33.4 | yes | pituitary<br>adenoma      | thyroid adenoma  |
| ID#091 | F | 16/10/2007 |            | 18/05/2008 | HEP | 7.1  | yes |                           | dystocia   |
| ID#092 | F | 16/10/2007 | 05/11/2009 |            | HEP | 24.7 | yes | lung carcinoma            | liver adenoma  |
| ID#094 | F | 16/10/2007 | 30/05/2010 |            | DIC | 31.5 | yes | n.d                       |  |
| ID#095 | F | 23/10/2007 | 27/06/2010 |            | HEP | 32.2 | yes | multiple<br>neoplasias    | lymphoma,<br>pituitary<br>carcinoma, thyroid<br>carcinoma, lung<br>carcinoma, cystic<br>endometrial<br>hyperplasia         |
| ID#097 | F | 23/10/2007 | 02/11/2009 |            | HEP | 24.4 | yes | lymphoma                  | pituitary adenoma  |
| ID#098 | F | 23/10/2007 | 14/02/2010 |            | HEP | 27.8 | yes | pituitary<br>adenoma      | lymphoma, thyroid<br>carcinoma,<br>endometrial<br>hyperplasia  |
| ID#099 | F | 23/10/2007 |            | 29/04/2009 | HEP | 18.2 | yes |                           | dermatitis   |
| ID#100 | M | 24/10/2007 | 29/06/2009 |            | HEP | 20.2 |     | renal failure             | thyroid adenoma,<br>hepatosteatosi,<br>nephropathy,<br>testicular atrophy  |
| ID#101 | F | 24/10/2007 | 01/11/2009 |            | HEP | 24.3 | yes | histiocytic<br>sarcoma    |  |
| ID#102 | F | 24/10/2007 |            | 06/04/2009 | HEP | 17.4 | yes |                           | dermatitis   |
| ID#103 | F | 24/10/2007 | 28/03/2010 |            | HEP | 29.1 | yes | pituitary<br>carcinoma    | intestinal adenoma   |
| ID#104 | F | 24/10/2007 | 24/01/2010 |            | HEP | 27.1 | yes | fibrosarcoma              | lymphoma   |
| ID#105 | M | 05/11/2007 |            | 22/08/2008 | EXP | 9.6  |     |                           |  |
| ID#106 | F | 05/11/2007 | 25/11/2009 |            | HEP | 25.1 | yes | lymphoma                  |  |
| ID#131 | M | 06/12/2007 | 09/11/2008 |            | HEP | 11.2 |     | n.d                       |  |

|        |   |            |            |            |     |      |     |                           |   |
|--------|---|------------|------------|------------|-----|------|-----|---------------------------|---|
| ID#133 | F | 06/12/2007 | 03/05/2010 |            | HEP | 28.9 | no  | lymphoma                  | thyroid adenoma,<br>liver adenoma   |
| ID#136 | M | 14/12/2007 | 16/02/2010 |            | HEP | 26.2 |     | cardiovascular<br>failure | thyroid hyperplasia   |
| ID#137 | M | 14/12/2007 | 01/06/2009 |            | HEP | 17.6 |     | renal failure             | low grade PIN,<br>liver adenoma   |
| ID#139 | F | 14/12/2007 | 18/04/2010 |            | HEP | 28.2 | no  | histiocytic<br>sarcoma    | thyroid adenoma,<br>mammary gland<br>adenoma,<br>pancreatitis,<br>nephropathy,<br>cystic endometrial<br>hyperplasia                         |
| ID#141 | M | 23/12/2007 | 20/10/2009 |            | HEP | 21.9 |     | cardiovascular<br>failure | thyroid adenoma,<br>nephropathy,<br>hepatitis   |
| ID#144 | F | 23/12/2007 | 15/11/2009 |            | HEP | 22.8 | no  | cardiovascular<br>failure |   |
| ID#145 | F | 23/12/2007 | 07/02/2010 |            | HEP | 25.6 | no  | lymphoma                  | lung carcinoma,<br>liver carcinoma,<br>pancreatitis,<br>thyroid hyperplasia   |
| ID#147 | M | 08/01/2008 |            | 18/06/2008 | EXP | 5.4  |     |                           |   |
| ID#148 | F | 08/01/2008 | 09/09/2010 |            | DIC | 32.1 | no  | n.d                       |   |
| ID#149 | M | 16/01/2008 | 21/05/2009 |            | HEP | 16.2 |     | histiocytic<br>sarcoma    | thyroid hyperplasia   |
| ID#150 | M | 16/01/2008 | 30/05/2010 |            | HEP | 28.5 |     | renal failure             | Peyer's patches<br>hyperplasia,<br>cardiac<br>hypertrophy,<br>thyroid<br>hyperplasia,<br>nephropathy,<br>prostatitis,<br>testicular atrophy |
| ID#153 | F | 16/01/2008 | 15/12/2010 |            | HEP | 35.0 | no  | lymphoma                  | thyroid hyperplasia   |
| ID#154 | F | 16/01/2008 |            | 28/05/2009 | HEP | 16.4 | no  |                           | dermatitis  |
| ID#155 | M | 21/01/2008 | 05/03/2009 |            | HEP | 13.5 |     | pneumonia                 |   |
| ID#156 | M | 26/01/2008 | 18/04/2010 |            | HEP | 26.7 |     | lymphoma                  | lung carcinoma  |
| ID#158 | M | 26/01/2008 | 16/10/2010 |            | HEP | 32.7 |     | n.d                       |   |
| ID#159 | F | 26/01/2008 | 07/03/2010 |            | HEP | 25.4 | no  | lymphoma                  | mammary gland<br>carcinoma, lung<br>adenoma, thyroid<br>adenoma,<br>pancreatitis  |
| ID#160 | F | 26/01/2008 | 12/10/2009 |            | HEP | 20.6 | no  | histiocytic<br>sarcoma    | cystic endometrial<br>hyperplasia   |
| ID#161 | F | 26/01/2008 | 07/02/2010 |            | DIC | 24.4 | no  | n.d                       |   |
| ID#162 | M | 29/01/2008 | 02/08/2009 |            | HEP | 18.1 |     | n.d                       |   |
| ID#163 | F | 29/01/2008 | 29/10/2009 |            | HEP | 21.0 | yes | lymphoma                  |   |
| ID#164 | F | 29/01/2008 | 26/08/2010 |            | HEP | 30.9 | yes | pituitary<br>carcinoma    | hepatosteatosi  |
| ID#165 | F | 29/01/2008 | 27/07/2010 |            | HEP | 29.9 | yes | cardiovascular<br>failure | pituitary<br>carcinoma,<br>pulmonary edema  |
| ID#209 | M | 19/03/2008 | 02/03/2010 |            | HEP | 23.5 |     | lymphoma                  | low grade PIN,<br>thyroid<br>hyperplasia,<br>pancreatitis,  |

|        |   |            |            |            |     |      |     |                        |   |
|--------|---|------------|------------|------------|-----|------|-----|------------------------|---|
|        |   |            |            |            |     |      |     |                        | testicular atrophy                                      |
| ID#210 | M | 19/03/2008 |            | 01/02/2010 | EXP | 22.5 |     |                        |   |
| ID#211 | M | 19/03/2008 | 25/07/2010 |            | HEP | 28.2 |     | histiocytic sarcoma    | lung carcinoma, thyroid hyperplasia                     |
| ID#212 | M | 19/03/2008 | 16/09/2010 |            | HEP | 30.0 |     | n.d                    |   |
| ID#213 | F | 19/03/2008 | 01/04/2010 |            | DIC | 24.4 | yes | n.d                    |   |
| ID#214 | F | 19/03/2008 |            | 25/10/2009 | HEP | 19.3 | yes |                        | dermatitis  |
| ID#215 | F | 19/03/2008 | 07/02/2010 |            | HEP | 22.7 | yes | lymphoma               |   |
| ID#217 | F | 19/03/2008 |            | 15/07/2008 | EXP | 3.9  | yes |                        |   |
| ID#222 | M | 25/03/2008 | 03/05/2010 |            | HEP | 25.3 |     | cardiovascular failure | low grade PIN, hepatosteatosi, nephritis, pancreatitis  |
| ID#227 | M | 01/04/2008 | 02/08/2009 |            | HEP | 16.1 |     | cardiovascular failure | intestinal carcinoma, testicular atrophy                |
| ID#232 | M | 07/04/2008 | 14/10/2010 |            | HEP | 30.3 |     | n.d                    |   |
| ID#234 | F | 07/04/2008 | 28/02/2010 |            | DIC | 22.8 | no  | n.d                    |   |
| ID#237 | M | 22/04/2008 | 17/10/2010 |            | HEP | 29.9 |     | liver carcinoma        | low grade PIN, testicular atrophy                       |
| ID#241 | F | 22/04/2008 | 29/08/2010 |            | HEP | 28.3 | no  | pituitary adenoma      | hepatosteatosi, cystic endometrial hyperplasia          |
| ID#243 | M | 22/04/2008 | 15/04/2010 |            | HEP | 23.8 |     | n.d                    |   |
| ID#247 | M | 08/05/2008 | 05/10/2010 |            | HEP | 28.9 |     | histiocytic sarcoma    | thyroid hyperplasia, pituitary hyperplasia, nephropathy |
| ID#248 | M | 08/05/2008 | 23/05/2010 |            | HEP | 24.5 |     | n.d                    |   |
| ID#249 | F | 08/05/2008 |            | 24/01/2010 | HEP | 20.6 | no  |                        | dermatitis  |
| ID#250 | F | 08/05/2008 |            | 09/11/2008 | EXP | 6.1  | no  |                        |   |
| ID#251 | F | 08/05/2008 | 10/06/2010 |            | HEP | 25.1 | no  | histiocytic sarcoma    | pituitary carcinoma, thyroid hyperplasia, pancreatitis  |
| ID#252 | F | 08/05/2008 | 15/08/2010 |            | HEP | 27.3 | no  | histiocytic sarcoma    | pituitary carcinoma, thyroid hyperplasia, pancreatitis  |
| ID#254 | F | 08/05/2008 | 17/06/2010 |            | HEP | 25.3 | no  | pituitary carcinoma    | endometrial cystic hyperplasia, pancreatitis            |
| ID#271 | F | 21/05/2008 | 17/08/2010 |            | HEP | 26.9 | no  | lymphoma               | pituitary adenoma, thyroid hyperplasia                  |
| ID#272 | M | 22/05/2008 |            | 13/10/2008 | EXP | 4.8  |     |                        |   |
| ID#274 | F | 22/05/2008 | 19/09/2010 |            | HEP | 28.0 | yes | n.d                    |   |
| ID#279 | F | 22/05/2008 | 28/03/2010 |            | HEP | 22.2 | no  | histiocytic sarcoma    |   |
| ID#289 | M | 30/05/2008 | 29/11/2009 |            | HEP | 18.0 |     | lymphoma               | prostate hyperplasia                                    |
| ID#306 | F | 10/06/2008 |            | 11/01/2010 | HEP | 19.1 | no  |                        | dermatitis  |
| ID#307 | F | 10/06/2008 | 29/08/2010 |            | HEP | 26.6 | no  | lymphoma               | pituitary adenoma, thyroid adenoma                      |
| ID#320 | F | 17/06/2008 | 23/11/2009 |            | DIC | 17.2 | no  | n.d                    |   |
| ID#321 | M | 18/06/2008 | 28/03/2010 |            | HEP | 21.3 |     | lymphoma               | liver carcinoma, hepatosteatosi                         |
| ID#322 | M | 18/06/2008 | 06/04/2010 |            | HEP | 21.6 |     | n.d                    |   |
| ID#323 | F | 18/06/2008 | 04/03/2010 |            | HEP | 20.5 | no  | n.d                    |   |

|        |   |            |            |            |     |      |     |                           |                               |
|--------|---|------------|------------|------------|-----|------|-----|---------------------------|-------------------------------|
| ID#330 | M | 27/06/2008 | 09/09/2010 |            | HEP | 26.4 |     | n.d                       |                               |
| ID#349 | F | 09/07/2008 | 14/10/2010 |            | HEP | 27.2 | no  | n.d                       |                               |
| ID#352 | F | 09/07/2008 | 03/09/2010 |            | DIC | 25.9 | no  | n.d                       |                               |
| ID#353 | M | 15/07/2008 | 19/10/2010 |            | HEP | 27.2 |     | seminal vesicles enlarged | low grade PIN                 |
| ID#355 | M | 15/07/2008 | 10/10/2010 |            | HEP | 26.9 |     | liver carcinoma           | Peyer's patches hyperplasia   |
| ID#380 | M | 30/07/2008 |            | 15/06/2009 | EXP | 10.5 |     |                           |                               |
| ID#408 | F | 27/08/2008 | 06/09/2010 |            | DIC | 24.3 | no  | n.d                       |                               |
| ID#411 | F | 28/08/2008 |            | 11/01/2010 | HEP | 16.5 | no  |                           | dermatitis                    |
| ID#431 | F | 13/09/2008 | 06/09/2010 |            | HEP | 23.8 | yes | lymphoma                  | pancreatitis, hepatosteatosis |
| ID#452 | F | 24/09/2008 | 18/06/2010 |            | DIC | 20.8 | no  | n.d                       |                               |
| ID#461 | M | 22/10/2008 | 11/02/2010 |            | HEP | 15.7 |     | n.d                       |                               |

| COHORT OF <i>Pten</i> <sup>tg</sup> MICE (n=63) |     |               |               |                   |                       |      |               |                         |   |
|---|-----|---------------|---------------|-------------------|-----------------------|------|---------------|-------------------------|---|
| ID  | sex | date of birth | date of death | date of censoring | endpoint <sup>a</sup> | age  | females mated | probable cause of death | other pathologies   |
| ID#004  | M   | 30/05/2007    | 19/11/2009    |                   | HEP                   | 29.7 |               | n.d                     | pancreatitis, thyroid hyperplasia                           |
| ID#005  | M   | 30/05/2007    | 14/01/2010    |                   | HEP                   | 31.6 |               | thyroid adenoma         | hepatitis   |
| ID#019  | F   | 20/06/2007    | 28/01/2010    |                   | HEP                   | 31.3 | yes           | pneumonia               | nephropathy, pancreatitis, hepatosteatosis                  |
| ID#038  | F   | 02/08/2007    |               | 28/02/2008        | HEP                   | 6.9  | yes           |                         | dystocia  |
| ID#051  | M   | 26/08/2007    |               | 23/03/2008        | HEP                   | 6.9  |               |                         | mal-occlusion   |
| ID#052  | M   | 26/08/2007    | 07/11/2010    |                   | HEP                   | 38.4 |               | liver carcinoma         | low grade PIN, testicular atrophy                           |
| ID#054  | M   | 26/08/2007    | 05/11/2009    |                   | HEP                   | 26.4 |               | nephropathy             | pancreatitis  |
| ID#060  | M   | 26/08/2007    | 21/01/2010    |                   | DIC                   | 28.8 |               | n.d                     |   |
| ID#064  | M   | 11/09/2007    | 10/06/2010    |                   | HEP                   | 33.0 |               | lymphoma                | lung adenoma  |
| ID#069  | F   | 11/09/2007    |               | 18/03/2008        | HEP                   | 6.2  | yes           |                         | dystocia  |
| ID#072  | M   | 23/09/2007    | 30/05/2010    |                   | HEP                   | 32.2 |               | cardiovascular failure  | pancreatitis, thyroid hyperplasia                           |
| ID#078  | F   | 01/10/2007    | 04/04/2010    |                   | HEP                   | 30.1 | no            | pituitary carcinoma     | corneal ulcer, liver adenoma, thyroid hyperplasia, lymphoma |
| ID#083  | M   | 14/10/2007    | 04/04/2010    |                   | HEP                   | 29.7 |               | n.d                     |   |
| ID#086  | F   | 14/10/2007    | 25/04/2010    |                   | HEP                   | 30.4 | no            | liver carcinoma         | thyroid hyperplasia   |
| ID#093  | M   | 23/10/2007    | 22/11/2010    |                   | HEP                   | 37.0 |               | cardiovascular failure  | lung carcinoma, nephropathy, pituitary hyperplasia          |
| ID#096  | F   | 23/10/2007    | 30/11/2009    |                   | DIC                   | 25.3 | yes           | n.d                     |   |
| ID#130  | M   | 06/12/2007    | 07/06/2009    |                   | DIC                   | 18.1 |               | n.d                     |   |
| ID#132  | M   | 06/12/2007    | 10/10/2010    |                   | HEP                   | 34.2 |               | n.d                     |   |



|        |   |            |            |            |       |      |     |                        |  |
|--------|---|------------|------------|------------|-------|------|-----|------------------------|--|
| ID#135 | F | 06/12/2007 | 22/11/2010 |            | HEP   | 35.6 | no  | cardiovascular failure | cystic endometrial hyperplasia, pancreatitis, nephropathy, pituitary adenoma |
| ID#138 | M | 14/12/2007 | 14/02/2010 |            | HEP   | 26.1 |     | liver carcinoma        | pancreatitis, glomerulosclerosis   |
| ID#142 | M | 23/12/2007 | 17/12/2009 |            | HEP   | 23.9 |     | cardiovascular failure | thyroid hyperplasia, hepaptitis  |
| ID#143 | M | 23/12/2007 |            | 01/02/2010 | EXP   | 25.4 |     |                        |  |
| ID#146 | F | 23/12/2007 | 30/11/2008 |            | HEP   | 11.3 | no  | ovary tumor            | hepatitis  |
| ID#151 | M | 16/01/2008 | 14/12/2009 |            | DIC   | 23.0 |     | n.d                    |  |
| ID#152 | F | 16/01/2008 | 26/10/2010 |            | HEP   | 33.3 | yes | lymphoma               | thyroid hyperplasia  |
| ID#157 | M | 26/01/2008 | 24/06/2010 |            | HEP   | 28.9 |     | cardiovascular failure | pancreatitis, nephropathy, thyroid hyperplasia, urothelial hyperplasia       |
| ID#216 | F | 19/03/2008 | 30/11/2010 |            | HEP   | 32.4 | no  | lymphoma               | thyroid hyperplasia  |
| ID#218 | F | 19/03/2008 | 06/02/2011 |            | HEP   | 34.7 | no  | corneal ulcer          | hepatitis, thyroid hiperplasia, nephropathy                                  |
| ID#220 | M | 20/03/2008 | 23/08/2010 |            | HEP   | 29.1 |     | corneal ulcer          | pancreatitis   |
| ID#229 | M | 07/04/2008 | 09/12/2010 |            | HEP   | 32.1 |     | renal failure          | thyroid hyperplasia  |
| ID#231 | M | 07/04/2008 | 07/06/2010 |            | HEP   | 26.0 |     | cardiovascular failure | liver carcinoma, nephropathy, testicular atrophy                             |
| ID#263 | M | 12/05/2008 | 13/12/2009 |            | HEP   | 19.1 |     | thyroid carcinoma      | hepatitis  |
| ID#270 | F | 21/05/2008 | 16/09/2010 |            | DIC   | 27.9 | no  | n.d                    |  |
| ID#280 | F | 22/05/2008 | 25/07/2010 |            | HEP   | 26.1 | no  | cardiovascular failure | cystic endometrial hyperplasia, nephropathy                                  |
| ID#311 | F | 13/06/2008 | 03/10/2010 |            | HEP   | 27.7 | yes | n.d                    |  |
| ID#334 | F | 27/06/2008 | 08/03/2010 |            | HEP   | 20.4 | no  | liver carcinoma        | hepatitis  |
| ID#338 | F | 30/06/2008 | 23/08/2010 |            | HEP   | 25.8 | no  | vasculitis             | thyroid hyperplasia  |
| ID#346 | M | 09/07/2008 |            | 08/10/2008 | EXP   | 3.0  |     |                        |  |
| ID#347 | M | 09/07/2008 |            | 08/10/2008 | EXP   | 3.0  |     |                        |  |
| ID#348 | M | 09/07/2008 |            | 08/10/2008 | EXP   | 3.0  |     |                        |  |
| ID#350 | F | 09/07/2008 | 23/11/2010 |            | DIC   | 28.5 | no  | n.d                    |  |
| ID#360 | M | 19/07/2008 |            | 08/10/2008 | EXP   | 2.7  |     |                        |  |
| ID#365 | F | 19/07/2008 | 24/3/11    |            | DIC   | 32.1 | no  | n.d                    |  |
| ID#382 | F | 30/07/2008 | 1511/2010  |            | HEP   | 27.5 | no  | cardiovascular failure | fibrosarcoma, pituitary adenoma  |
| ID#393 | M | 04/08/2008 |            | 06/04/2010 | EXP   | 20.1 |     |                        |  |
| ID#410 | M | 28/08/2008 |            | 06/04/2010 | EXP   | 19.3 |     |                        |  |
| ID#412 | F | 28/08/2008 |            |            | ALIVE | 30.6 | yes |                        |  |
| ID#425 | F | 12/09/2008 |            | 04/04/2010 | HEP   | 18.7 | yes |                        | mal-occlusion  |
| ID#427 | F | 12/09/2008 |            |            | ALIVE | 30.1 | no  |                        |  |

|        |   |            |            |            |       |      |     |                 |  |
|--------|---|------------|------------|------------|-------|------|-----|-----------------|--|
| ID#430 | F | 13/09/2008 | 03/02/2011 |            | HEP   | 28.7 | no  | n.d             | thyroid hyperplasia, hepaptitis, nephropathy |
| ID#463 | M | 22/10/2008 |            | 22/11/2010 | HEP   | 25.0 |     |                 | dermatitis                                   |
| ID#468 | M | 26/10/2008 | 27/09/2010 |            | HEP   | 23.1 |     | n.d             | n.d  |
| ID#469 | M | 26/10/2008 | 21/06/2010 |            | HEP   | 19.8 |     | liver carcinoma | nephropathy                                  |
| ID#472 | F | 26/10/2008 | 20/01/2011 |            | HEP   | 26.8 | yes | n.d             | thyroid hyperplasia, nephropathy, hepatitis  |
| ID#501 | F | 26/12/2008 |            |            | ALIVE | 26.7 | no  |                 |  |
| ID#531 | M | 23/01/2009 |            | 30/11/2010 | HEP   | 22.2 |     |                 | dermatitis                                   |
| ID#535 | F | 23/01/2009 |            | 10/02/2010 | EXP   | 12.6 | yes |                 |  |
| ID#599 | F | 20/05/2009 |            |            | ALIVE | 21.9 | yes |                 |  |
| ID#613 | F | 05/07/2009 |            |            | ALIVE | 20.4 | yes |                 |  |
| ID#614 | F | 05/07/2009 |            |            | ALIVE | 20.4 | yes |                 |  |
| ID#616 | F | 29/07/2009 |            |            | ALIVE | 19.6 | yes |                 |  |
| ID#651 | M | 27/08/2009 |            | 07/11/2010 | HEP   | 14.4 |     |                 | dermatitis                                   |
| ID#681 | F | 06/10/2009 |            | 16/03/2010 | HEP   | 5.3  | no  |                 | malformation                                 |

- <sup>a</sup> HEP: Humane End Point; mice were euthanized after clear signs of morbidity and discomfort according to the Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research (<http://dels.nas.edu/global/ilar/Guide>). Cages were supervised daily by trained personnel. DIC: Dead In Cage; mice were found dead in their cages without previous signs of morbidity. EXP: mice were used for experimentation.
- <sup>b</sup> Some females were used for mating occasionally. Those that were mated at least once are indicated. Mating had no impact on longevity as shown in Supplementary Figure 5.

**Supplementary Table 3.** Summary of the cohorts

| genotype                  | sex    | recruited  | censored | non-censored | alive | dead             |                  |
|---------------------------|--------|------------|----------|--------------|-------|------------------|------------------|
|                           |        |            |          |              |       | HEP <sup>a</sup> | DIC <sup>b</sup> |
| wt                        | male   | <b>49</b>  | 7        | 42           | 0     | 40               | 2                |
|                           | female | <b>63</b>  | 11       | 52           | 0     | 41               | 11               |
|                           | m+f    | <b>112</b> | 18       | 94           | 0     | 81               | 13               |
| <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | male   | <b>32</b>  | 11       | 21           | 0     | 18               | 3                |
|                           | female | <b>31</b>  | 5        | 26           | 7     | 15               | 4                |
|                           | m+f    | <b>63</b>  | 16       | 47           | 7     | 33               | 7                |

- <sup>a</sup> HEP: Humane End Point; mice were euthanized after clear signs of morbidity and discomfort according to the Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research. Cages were supervised daily by trained personnel.
- <sup>b</sup> DIC: Dead In Cage; mice were found dead in their cages without previous signs of morbidity.

**Supplementary Table 4.** Censored mice

| cause of censoring               | genotype                        | males     | females   | total censored |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|----------------|
| experimentation                  | wt                              | 5         | 2         | 7              |
|                                  | <i>Pten</i> <sup>tg</sup>       | 7         | 1         | 8              |
| mal-occlusion<br>or malformation | wt                              | 0         | 0         | 0              |
|                                  | <i>Pten</i> <sup>tg</sup>       | 1         | 2         | 3              |
| dystocia                         | wt                              | n.a.      | 1         | 1              |
|                                  | <i>Pten</i> <sup>tg</sup>       | n.a.      | 2         | 2              |
| dermatitis                       | wt                              | 2         | 8         | 10             |
|                                  | <i>Pten</i> <sup>tg</sup>       | 3         | 0         | 3              |
| <b>total censored</b>            | <b>wt</b>                       | <b>7</b>  | <b>11</b> | <b>18</b>      |
|                                  | <b><i>Pten</i><sup>tg</sup></b> | <b>11</b> | <b>5</b>  | <b>16</b>      |

**Supplementary Table 5.** Log-rank test comparisons and hazard ratios

| sex    | comparison                      | log-rank test  |                   | hazard<br>ratio | 95%<br>CI of ratio | median                                       |
|--------|---------------------------------|----------------|-------------------|-----------------|--------------------|--|
|        |                                 | X <sup>2</sup> | <i>p</i>          |                 |                    |  |
| male   | wt vs <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 7.051          | <b>0.0079</b>     | 2.220           | 1.315-3746         | wt: 26.0<br><i>Pten</i> <sup>tg</sup> : 29.1 |
| female | wt vs <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 8.788          | <b>0.003</b>      | 2.131           | 1.209-3.172        | wt: 25.9<br><i>Pten</i> <sup>tg</sup> : 28.7 |
| m+f    | wt vs <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 16.71          | <b>&lt;0.0001</b> | 2.117           | 1.455-2.952        | wt: 25.9<br><i>Pten</i> <sup>tg</sup> : 28.9 |

**Supplementary Table 6.** Survival data <sup>a</sup>

| sex     | genotype                  | n <sup>b</sup> | range     | mean longevity ± s.d.                  |   |   |
|---------|---------------------------|----------------|-----------|--|---|---|
|         |                           |                |           | all<br>( <i>p</i> -value) <sup>c</sup> | oldest 20%<br>( <i>p</i> -value) <sup>c</sup> | oldest 10%<br>( <i>p</i> -value) <sup>c</sup> |
| males   | wt                        | 42             | 11.2-33.8 | 23.8±5.6                               | 30.8±1.8                                      | 32.2±1.5                                      |
|         | <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 21             | 18.1-38.4 | 28.1±5.6<br><b>(0.005)</b>             | 35.7±2.5<br><b>(0.003)</b>                    | 37.7±1.0<br><b>(0.010)</b>                    |
| females | wt                        | 52             | 17.2-35.0 | 26.1±4.0                               | 31.9±1.8                                      | 33.2±1.1                                      |
|         | <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 19             | 11.3-35.6 | 28.2±5.5<br>(0.08)                     | 34.0±1.4<br>(0.05)                            | 35.1±0.7<br>(0.07)                            |
| m+f     | wt                        | 94             | 11.2-35.0 | 25.1±4.9                               | 31.1±1.9                                      | 32.5±1.3                                      |
|         | <i>Pten</i> <sup>tg</sup> | 40             | 11.3-38.4 | 28.2±5.5<br><b>(0.002)</b>             | 34.8±2.1<br><b>(&lt;0.0001)</b>               | 36.4±1.7<br><b>(0.0002)</b>                   |

<sup>a</sup> All data in months.<sup>b</sup> Only non-censored mice (censored mice and alive mice excluded).<sup>c</sup> Student's *t*-test.

# Supplementary Table 7. Cox regression analysis <sup>a</sup>

## Univariant Cox Analysis (complete cohort, n=175)

| covariate   | B      | SE    | Wald   | df | sig.   | exp(B) | 95% CI<br>Low - High |       |
|-------------|--------|-------|--------|----|--------|--------|----------------------|-------|
| SEX         | -0.114 | 0.175 | 0.419  | 1  | 0.517  | 0.893  | 0.633                | 1.259 |
| GEN         | -0.787 | 0.200 | 15.480 | 1  | <10e-3 | 0.455  | 0.308                | 0.674 |
| DOB         | 0.012  | 0.007 | 3.016  | 1  | 0.082  | 1.012  | 0.998                | 1.026 |
| MOM         | -0.004 | 0.009 | 0.158  | 1  | 0.691  | 0.996  | 0.978                | 1.015 |
| DAD         | 0.025  | 0.018 | 1.877  | 1  | 0.171  | 1.026  | 0.989                | 1.063 |
| Parental_ID | 0.020  | 0.012 | 2.665  | 1  | 0.103  | 1.020  | 0.996                | 1.045 |

<sup>a</sup> DOB: Date of birth, MOM: Mother, DAD: Father0. Parental\_ID: mother/father couple0. The variables sex and genotype (GEN) were replaced with a set of indicator variables to denote the presence or absence of category membership0. B is the un-standardised regression coefficient and its standard error (SE), its Wald test statistic value (Wald), the degrees of freedom (df), and the significance (Sig0.0. Exp(B) for the covariate of interest is the predicted change of the hazard ratio for a unit increase in the predictor and the 95% confidence interval (CI) for exp (B)0. (n=112 for wt, and n=63 for Pten-tg mice).

## Supplementary Table 8. Primers used in qRT-PCR

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| Actin-Fw   | 5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3'  |
| Actin-Rv   | 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'   |
| Adipoq-Fw  | 5'-GGATGCTACTGTTGCAAGCTC-3'  |
| Adipoq-Rv  | 5'-TCCTGTCATTCCAACATCTCC-3'  |
| Adipor1-Fw | 5'-GCATCTCTGCCATCATTGTG-3'   |
| Adipor1-Rv | 5'-TGGACACACCATAGAAGTGGAC-3' |
| Adipor2-Fw | 5'-GAGCCCAGCTTAGAGACACCT-3'  |
| Adipor2-Rv | 5'-TAGCACATCGTGAGGGATCA-3'   |
| aP2-Fw     | 5'-GCAGACGACAGGAAGGTGA-3'    |
| aP2-Rv     | 5'-CTTGTGGAAGTCACGCCTTT-3'   |
| Cidea-Fw   | 5'-ATCACAACCTGGCCTGGTTACG-3' |
| Cidea-Rv   | 5'-TACTACCCGGTGTCCATTTCT-3'  |
| CoxIVb-Fw  | 5'-AGATGAACCATCGCTCCAAC-3'   |
| CoxIVb-Rv  | 5'-ATGGGGTTGCTCTTCATGTC-3'   |
| Cpt1b-Fw   | 5'-CAAGTCATGGTGGGCAACTA-3'   |
| Cpt1b-Rv   | 5'-GCTGCTTGCACATTTGTGTT-3'   |
| Cytc-Fw    | 5'-GGAGGCAAGCATAAGACTGG-3'   |
| Cytc-Rv    | 5'-TCCATCAGGGTATCCTCTCC-3'   |
| Elov13-Fw  | 5'-GATGGTTCTGGGCACCATCTT-3'  |
| Elov13-Rv  | 5'-CGTTGTTGTGTGGCATCCTT-3'   |
| Glut4-Fw   | 5'-ACGGTCTTCACGTTGGTCTC-3'   |
| Glut4-Rv   | 5'-CTCAAAGAAGGCCACAAAGC-3'   |
| Lcad-Fw    | 5'-TTGGATTCTCAATGGAAGCA-3'   |
| Lcad-Rv    | 5'-GGCAATCGGACATCTTCAA-3'    |
| Mcad-Fw    | 5'-GGAGCAGCCAATGATGTGT-3'    |
| Mcad-Rv    | 5'-GGTTAGAACGTGCCAACAAGA-3'  |

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| Myh2-Fw  | 5'-GCAAACACGAGAGACGAGTG-3'        |
| Myh2-Rv  | 5'-CAGCTTGTTGACCTGGGACT-3'        |
| Myh4-Fw  | 5'-AACCTGATGCAGGCTGAGAT-3'        |
| Myh4-Rv  | 5'-TCCTGCTCCTTCTTCAGCTC-3'        |
| Pdk4-Fw  | 5'-CGCTTAGTGAACACTCCTTCG-3'       |
| Pdk4-Rv  | 5'-CGAACTTTGACCAGCGTGT-3'         |
| Pgc1a-Fw | 5'-AAGTGTGGAACCTCTCTGGAACCTG-3'   |
| Pgc1a-Rv | 5'-GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG-3'     |
| Ppard-Fw | 5'-ACCAGAACACACGCTTCCTT-3'        |
| Ppard-Rv | 5'-TTGCGGTTCTTCTTCTGGAT-3'        |
| Pparg-Fw | 5'-AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG-3'     |
| Pparg-Rv | 5'-TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3'      |
| Pten-Fw  | 5'-CAAATATTATTGCTATGGGATTCCTGC-3' |
| Pten-Rv  | 5'-GCTGTGGTGGGTTATGGTCTTC-3'      |
| Tnni-Fw  | 5'-GCCTCCACAACACCAGAGAG-3'        |
| Tnni-Rv  | 5'-GCCAGACATAGCCTCCACAT-3'        |
| Ucp1-Fw  | 5'-ACTGCCACACCTCCAGTCATT-3'       |
| Ucp1-Rv  | 5'-CTTTGCCTCACTCAGGATTGG-3'       |
| Ucp3-Fw  | 5'-ACTCCAGCGTCGCCATCAGGATTCT-3'   |
| Ucp3-Rv  | 5'-TAAACAGGTGAGACTCCAGCAACTT-3'   |

# Cancer Research

## Induction of p53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin

Alejo Efeyan, Ana Ortega-Molina, Susana Velasco-Miguel, et al.

*Cancer Res* 2007;67:7350-7357. Published online August 1, 2007.

**Updated Version**

Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-07-0200](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0200)

**Supplementary  
Material**

Access the most recent supplemental material at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2007/08/01/67.15.7350.DC1.html>

**Cited Articles**

This article cites 49 articles, 17 of which you can access for free at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/15/7350.full.html#ref-list-1>

**Citing Articles**

This article has been cited by 14 HighWire-hosted articles. Access the articles at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/15/7350.full.html#related-urls>

**E-mail alerts**

[Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

**Reprints and  
Subscriptions**

To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions**

To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at [permissions@aacr.org](mailto:permissions@aacr.org).

## Research Article

# Induction of p53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin

Alejo Efeyan,<sup>1</sup> Ana Ortega-Molina,<sup>1</sup> Susana Velasco-Miguel,<sup>1</sup> Daniel Herranz,<sup>1</sup> Lyubomir T. Vassilev,<sup>2</sup> and Manuel Serrano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain and <sup>2</sup>Discovery Oncology, Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey

## Abstract

Cellular senescence is emerging as an important *in vivo* anti-cancer response elicited by multiple stresses, including currently used chemotherapeutic drugs. Nutlin-3a is a recently discovered small-molecule antagonist of the p53-destabilizing protein murine double minute-2 (MDM2) that induces cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells with functional p53. Here, we report that nutlin-3a induces cellular senescence in murine primary fibroblasts, oncogenically transformed fibroblasts, and fibrosarcoma cell lines. No evidence of drug-induced apoptosis was observed in any case. Nutlin-induced senescence was strictly dependent on the presence of functional p53 as revealed by the fact that cells lacking p53 were completely insensitive to the drug, whereas cells lacking the tumor suppressor alternative reading frame product of the *CDKN2A* locus underwent irreversible cell cycle arrest. Interestingly, irreversibility was achieved in neoplastic cells faster than in their corresponding parental primary cells, suggesting that nutlin-3a and oncogenic signaling cooperate in activating p53. Our current results suggest that senescence could be a major cellular outcome of cancer therapy by antagonists of the p53-MDM2 interaction, such as nutlin-3a. [Cancer Res 2007;67(15):7350–7]

## Introduction

The tumor suppressor p53 is among the most important anti-tumoral defenses in mammalian cells. This is reflected by the fact that the large majority of malignant tumors have acquired mutations that impair the functionality of p53. All together, approximately half of all human malignancies harbor mutations in p53 (1). The remaining tumors usually contain alterations in the two main regulators of p53 stability [i.e., amplification of the negative p53 regulator murine double minute-2 (MDM2) or loss of the MDM2 inhibitor alternative reading frame product of the *CDKN2A* locus (ARF); refs. 1–3]. In agreement with the high frequency of aberrations in the ARF/MDM2 regulatory pair, we and others have recently shown that ARF is critical in mice for p53-dependent tumor suppression (4, 5).

The importance of ARF for p53-dependent cancer protection suggests that ARF-mimicking drugs could have therapeutic activity in p53-proficient cancers. Nutlin-3a was recently discovered as a

small molecule that binds MDM2 at the pocket used for interaction with p53 (6–8). Hence, nutlin-3a prevents MDM2 from recognizing p53 and, consequently, it results in stabilization of p53 and activation of the p53 pathway. p53 is thought to acquire full transcriptional activity by the concurrence of two effects: stabilization, usually achieved by inhibition of MDM2, and posttranslational modifications produced by stress signaling cascades (1). Cancer cells, and even normal cells under *in vitro* culture conditions, are subject to intrinsic and extrinsic stresses, generally presenting high constitutive levels of DNA damage signaling; therefore, it is not surprising that stabilization of p53 by nutlin-3a suffices to trigger p53 transcriptional activity. Moreover, it is also possible that simple stabilization of p53, in the absence of stress signaling, could be sufficient to activate a p53 transcriptional response (9, 10). The rationale for using MDM2 antagonists in cancer treatment is twofold (8). First, malignant cells have constitutive stress signals, particularly DNA damage signaling (11, 12), which presumably will contribute to enhance the p53 activation upon treatment with a p53-stabilizing drug. In this regard, additional infliction of damage to tumor cells by standard genotoxic chemotherapy is known to enhance the effects of nutlin (13–17). Second, normal cells, by having intact checkpoints and low stress signaling, are thought to undergo a mild and transitory p53-dependent cell cycle arrest after treatment with nutlin, and this transient arrest, in fact, may protect normal cells from the toxicity of standard chemotherapy (18, 19). The latter approach implies that nutlin, by protecting normal tissues, could increase the therapeutic window to standard chemotherapy even in the treatment of p53-deficient tumors.

The study of the cellular responses elicited by nutlin has been restricted mainly to cell cycle arrest and apoptosis; however, the ability of nutlin to induce cellular senescence has remained unexplored. Cellular senescence is emerging as a particular type of cell cycle arrest of high relevance for tumor suppression and chemotherapy response (20–23). Indeed, there are indications that senescence may play an important role in tumor regression induced by standard genotoxic chemotherapy (24, 25). Cellular senescence is triggered by a multitude of stresses and, in general, it requires the engagement of the Rb and p53 tumor suppressor pathways (26). A main feature that distinguishes cellular senescence from other forms of cell cycle arrest is the irreversibility of this phenomenon. Full engagement of the Rb and p53 pathways results in chromatin remodeling that includes the heterochromatinization of genes important for proliferation (27–29). In this manner, cellular senescence is a terminal stage that prevents further proliferation of the cell, even if the initial causative stress is eliminated or transient. As we have discussed elsewhere (22), the fact that senescent cells are viable *in vitro* for long periods of time does not necessarily imply a long-term residence time in the context of the organism. In this regard, it has recently been shown that the induction of

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Requests for reprints:** Manuel Serrano, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), 3 Melchor Fernandez Almagro Street, Madrid E-28029, Spain. Phone: 34-91-732-8032; Fax: 34-91-732-8028; E-mail: mserrano@cnio.es.

©2007 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0200

tumor senescence by p53 is followed by clearance of the senescent cells by the innate immune system, which results in tumor regression (30, 31). Here, we have taken advantage of genetically defined mouse cells, either primary or neoplastically transformed, to examine the ability of nutlin-3a to induce senescence.

## Materials and Methods

**Cells and reagents.** Mouse embryonic fibroblasts (MEF) from E13.5 embryos of wild-type (wt), ARF-null (32), p53-null (33), or p21-null (34) genotype were obtained as previously described (35) and grown in the presence of atmospheric oxygen and in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone). In all experiments, low-passage (<3 passages) MEFs were used. Oncogenic Ras (H-Ras<sup>V12</sup>) was ectopically expressed from vector pLPC-puro and cells were retrovirally transduced following standard procedures (36). Infected cells were selected with 1.5  $\mu$ g/mL puromycin for 2 to 3 days as described (37). Murine fibrosarcoma cell lines were obtained from tumors induced with 3-methyl-cholanthrene as previously described (38). On observation of overt tumors, mice were sacrificed and tumors were excised and processed as follows. The tumor mass was immersed briefly in PBS with antibiotics. Small pieces of the tumor mass were minced in DMEM plus 10% FBS with scissors and allowed to attach to 60-mm-diameter dishes. Clonal cell lines were established from tumor outgrowths after four to six passages. Nutlin-3a and nutlin-3b were provided by Hoffman-La Roche, Inc..

**Colony formation assays.** Cells ( $10^4$ ) were seeded in 10-cm-diameter plates and treatment was initiated the following day by addition of nutlin-3a or nutlin-3b (5  $\mu$ mol/L). The drug was added only at the beginning of the treatment. One week later, cells were fixed in paraformaldehyde and stained with Giemsa. For reversibility studies, cells were exposed to the drug for 1 week, followed by another week in the absence of the drug.

**Proliferation assays.** Cells ( $5 \times 10^4$ ) were plated in 3.5-cm-diameter plates and, 24 h later, 5 or 10  $\mu$ mol/L of nutlin-3a or nutlin-3b was added. For direct cell counting, attached cells were trypsinized and counted using a Neubauer chamber slide. Reversibility was evaluated by exposing the cells to the drug for variable periods of time, as indicated, followed by a recovery period of 3 days in the absence of the drug. For S-phase and sub-G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> quantification, both floating and attached cells were fixed in 70% ethanol, resuspended in PBS, and treated with RNase A. Propidium iodide was added to the cells and cell cycle profiles were analyzed by flow cytometry in a FACScalibur instrument (BD Biosciences) and using the ModFit software (Verity Software House).

**Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase staining.** Cells ( $5 \times 10^4$ ) were plated in 3.5-cm-diameter plates and treated for 1 week with nutlin-3a or nutlin-3b (10  $\mu$ mol/L). For senescence-activated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ Gal) staining, we used Senescence- $\beta$ Gal Staining Kit (Cell Signaling Technology) following the manufacturer's instructions.

**Immunoblots.** Whole-cell protein extracts were obtained using RIPA buffer. For immunoblotting, we used the following primary antibodies: anti-p53 (NCL-p53-CM-5p, Novocastra), anti-phospho-Ser<sup>18</sup> p53 (Cell Signaling Technology), anti-p21 (p21-C-19-G, Santa Cruz Biotechnology), anti-MDM2 (2A10, Abcam), and anti- $\beta$ -actin (clone AC-15, Sigma). Protein levels were visualized after incubation with the appropriate secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase followed by detection with enhanced chemiluminescence plus (Amersham).

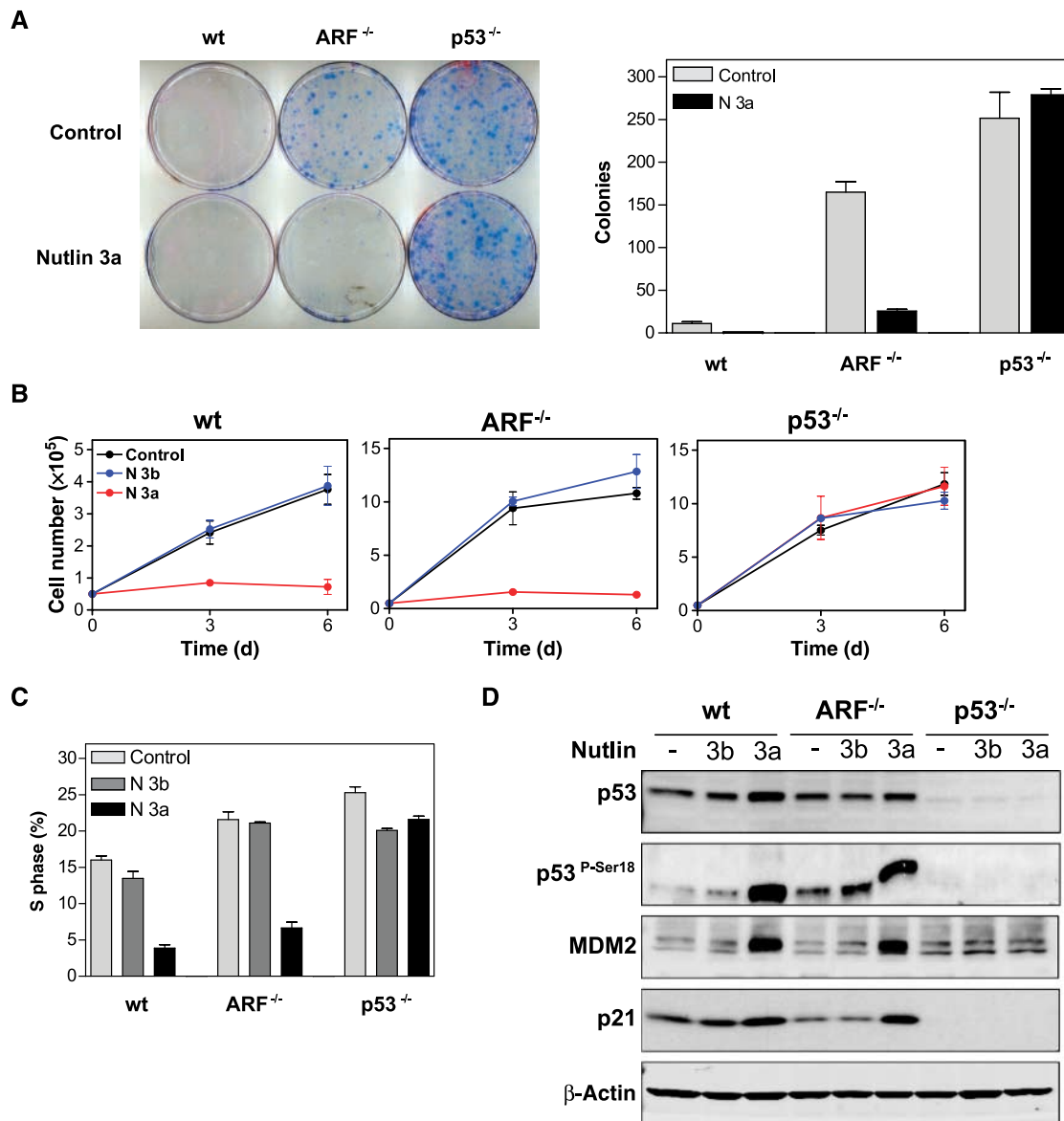
## Results

**Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in primary MEFs.** Normal primary MEFs have a limited proliferation potential under standard culture conditions (i.e., 20% oxygen and 10% serum) due to the accumulation of oxidative and mitogenic stress (39, 40). The main molecular barrier activated by "in vitro culture" stress in murine fibroblasts is the ARF/p53 pathway and, accordingly, ARF-null or p53-null MEFs have an indefinite proliferative potential in culture (32, 41). Culture stress can be

evaluated by plating cells at low density and scoring their ability to form colonies. We began our studies on nutlin by evaluating its effect on colony formation. In the presence of nutlin-3a, primary ARF-null MEFs lost their capacity to form colonies whereas p53-null MEFs were completely insensitive (Fig. 1A). Wild-type MEFs, as expected, could not form colonies either in the absence or presence of nutlin-3a. To better define the antiproliferative effect of nutlin-3a, we carried out short-term proliferation assays. Cell proliferation was measured directly by cell counting (Fig. 1B) and by cytometry to measure the proportion of cells in S phase (Fig. 1C). Nutlin-3a was a potent proliferation inhibitor for wt and ARF-null MEFs, whereas it had no effect on the proliferation of p53-null MEFs. As a control, the enantiomer nutlin-3b, which has 150-fold less activity compared with nutlin-3a (7), did not affect the proliferation of MEFs (Fig. 1B and C). Noteworthy, cell numbers for wt and ARF-null MEFs remained essentially constant in the presence of nutlin-3a, suggesting that the drug has a cytostatic effect on these cells (see Fig. 1B). In this regard, cytometric analyses did not show evidence of apoptosis in any of the genotypes on prolonged exposure to nutlin-3a (data not shown). The activation of p53 by nutlin-3a was confirmed by immunoblot analysis that showed stabilization of p53, increased p53 phosphorylation at Ser<sup>18</sup>, and increased levels of the p53 downstream targets MDM2 and p21 (Fig. 1D). It is known that p21 is an important, although not essential, mediator of p53-dependent cell cycle arrest (42). In line with this, we observed that p21-null MEFs arrest efficiently on treatment with nutlin (Supplementary Fig. S1A), although the irreversibility of the arrest has slower kinetics compared with wt MEFs (see below). Together, these results indicate that nutlin-3a inhibits the proliferation of primary MEFs in a p53-dependent manner.

**Nutlin-3a induces p53-dependent arrest in MEFs expressing oncogenic Ras.** Primary ARF-null MEFs and p53-null MEFs are permissive to Ras-driven proliferation, whereas wt MEFs undergo a permanent proliferative arrest, termed oncogene-induced senescence, which is dependent on the activation of the ARF/p53 pathway (43). We wondered whether the presence of oncogenic signaling would affect the response of cells to nutlin. Primary MEFs of different genotypes were retrovirally transduced with H-Ras<sup>V12</sup> and the resulting cells were tested for their sensitivity to nutlin. The ability of ARF-null/Ras MEFs to form macroscopic colonies was completely abrogated in the presence of Nutlin-3a, whereas p53-null/Ras MEFs were not affected by the presence of the drug (Fig. 2A). As expected, wt/Ras MEFs were unable to form colonies even in the absence of nutlin due to the activation of oncogene-induced senescence. In short-term assays, the proliferation of ARF-null/Ras MEFs was completely blocked by nutlin-3a, whereas p53-null/Ras MEFs proliferated in the presence of the drug (Fig. 2B). On the other hand, Ras-infected wt or p21-null MEFs had a severely impaired proliferation due to oncogenic stress, and the residual proliferation disappeared in the presence of nutlin-3a (see Fig. 2B and Supplementary Fig. S1B). As it was the case with primary MEFs, the drug seemed to have a cytostatic effect and no evidence of apoptosis was observed in any of the Ras-expressing cells regardless of the functionality of the ARF/p53/p21 pathway (data not shown). As shown in Fig. 2C, the stabilization and activation of p53 was confirmed by immunoblot analysis in MEFs after selection of retrovirally infected cells (i.e., before the onset of oncogene-induced senescence in wt/Ras MEFs). A strong accumulation of p53 and phospho-Ser<sup>18</sup> p53 was evident in wt/Ras and ARF-null/Ras cells treated with nutlin-3a, together



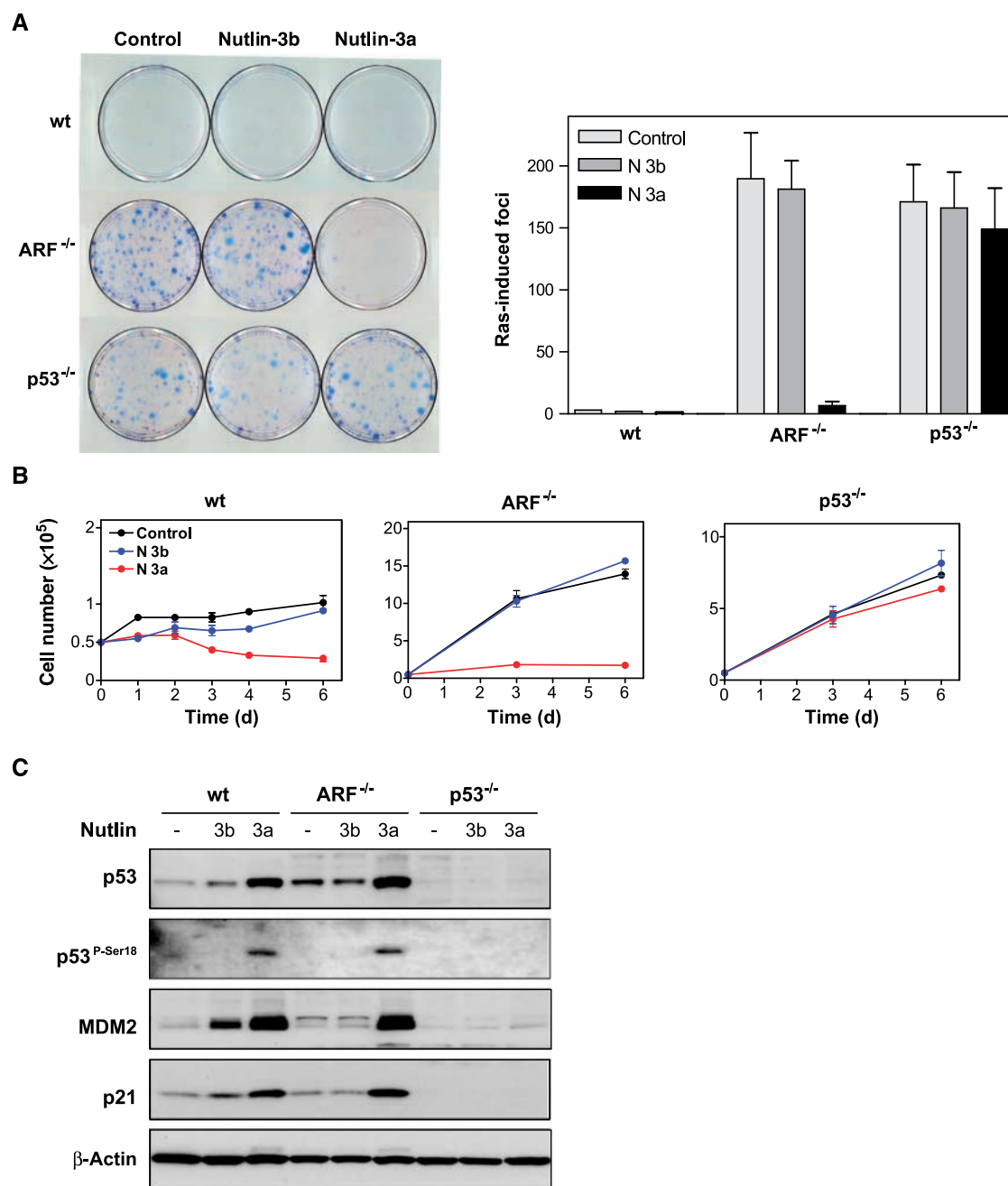


**Figure 1.** Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in primary MEFs. *A*, cells of the indicated genotypes were seeded and allowed to form macroscopic colonies during 1 wk in the absence or presence of nutlin-3a (5  $\mu$ M/L); after this time, plates were fixed and stained (*left*). The number of colonies was scored in three independently derived MEFs for each genotype (*right*). Columns, average; bars, SE. *B*, MEFs of the indicated genotypes were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (5  $\mu$ M/L) and the number of cells was counted at the indicated days. Points, average of three independent MEF preparations for each genotype; bars, SE. Representative of a total of three assays. *C*, cells treated for 2 d with nutlin-3a or nutlin-3b (10  $\mu$ M/L) were used to quantify the proportion of cells in S phase by cytometry using propidium iodide. *D*, immunoblot analysis of cells treated for 8 h with nutlin-3a or nutlin-3b (5  $\mu$ M/L).

with increased levels of p21 and MDM2. In summary, we conclude that nutlin-3a blocks Ras-driven proliferation of MEFs in a p53-dependent manner.

**Nutlin-3a induces p53-dependent senescence.** The activation of the p53 pathway, either by strong DNA damage or by oncogenic stress, is known to result in an irreversible cell cycle arrest termed senescence (44, 45). We asked whether the cell cycle arrest produced by nutlin in primary MEFs and Ras-infected MEFs had features of senescence. First, nutlin-3a induced a p53-dependent morphologic change in primary MEFs (not shown) and in Ras-infected cells (Fig. 3*A*, *left*), which is compatible with senescence

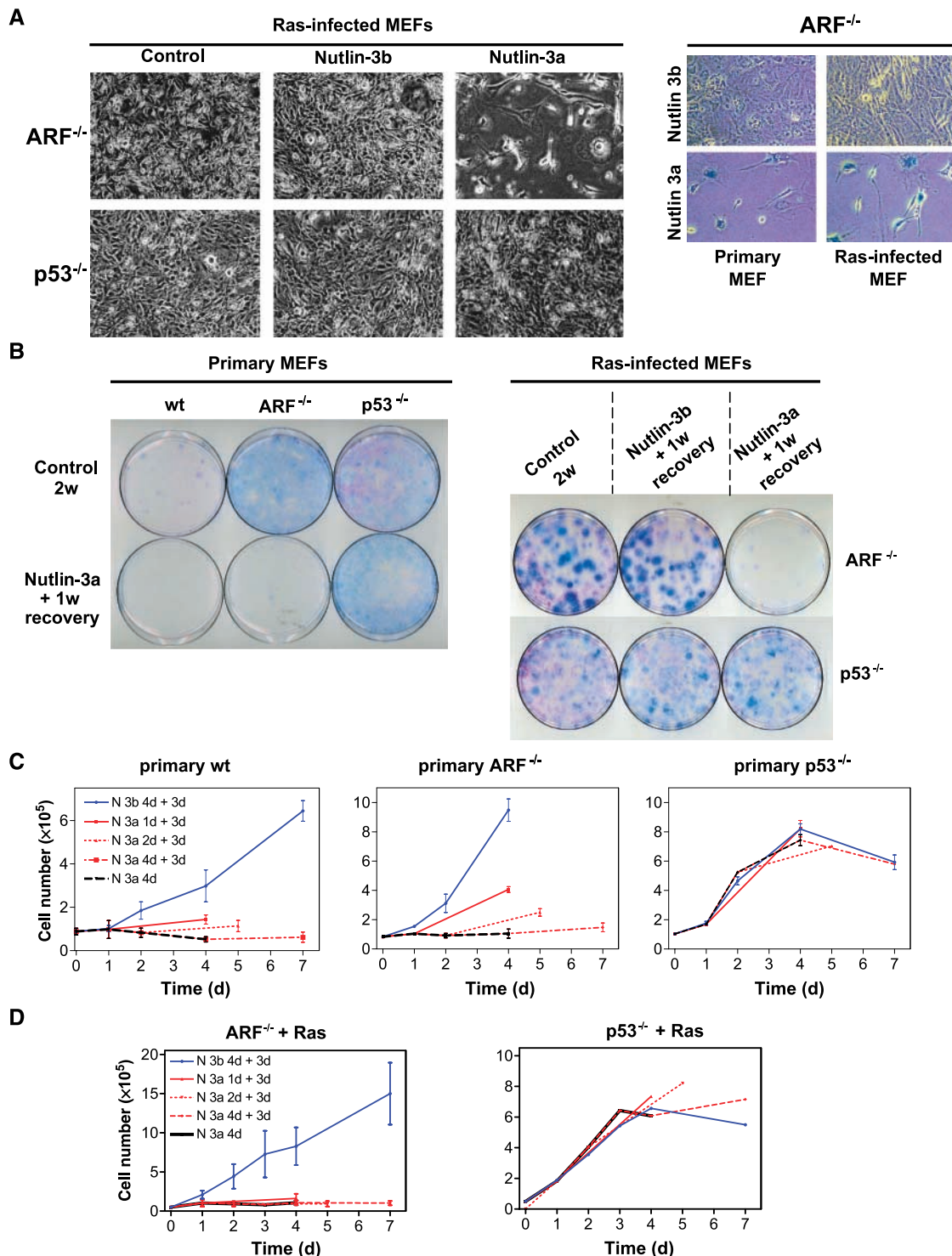
(i.e., large and flat cells). Moreover, both primary and Ras-infected ARF-null MEFs treated with nutlin-3a became positive for the widely used senescence marker SA- $\beta$ Gal (Fig. 3*A*, *right*; ref. 46). As a first approach to evaluate the irreversibility of the arrest induced by nutlin, we carried out colony formation assays in which cells were exposed to the drug for 1 week and then were incubated for an additional week in the absence of the drug. Both primary and Ras-infected ARF-null MEFs were unable to form colonies under these conditions (Fig. 3*B*), suggesting that the arrest induced by nutlin is irreversible after 1 week of exposure to the drug. To estimate the minimal exposure time required to trigger an irreversible cell cycle



**Figure 2.** Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in Ras-infected MEFs. *A*, Ras-infected MEFs of the indicated genotypes were seeded and allowed to form macroscopic colonies during 1 wk in the absence or presence of nutlin-3a or nutlin-3b (5  $\mu$ mol/L); after this time, plates were fixed and stained (*left*). The number of colonies was scored in three independently derived MEFs for each genotype (*right*). *Columns*, average; *bars*, SE. *B*, Ras-infected MEFs of the indicated genotypes were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (5  $\mu$ mol/L) and the number of cells was counted at the indicated times. *Points*, average of two or three independent MEF preparations for each genotype; *bars*, SE. Representative of a total of three assays. *C*, Ras-infected MEFs were treated for 24 h with nutlin-3a or nutlin-3b (10  $\mu$ mol/L) and the status of the p53 pathway was analyzed by immunoblot. Treatment with the drug was begun 1 d after selection of Ras-infected MEFs (for 2–3 d with puromycin).

arrest, cells were treated for various time periods and then observed for their ability to resume proliferation. In the case of primary wt MEFs, 1 day of treatment was sufficient to produce an irreversible arrest (Fig. 3C). ARF-null MEFs also underwent an irreversible arrest but this required longer exposure time (4 days; see Fig. 3C). As anticipated, p53-null MEFs were insensitive to the drug. Finally, in the case of p21-null MEFs, complete irrevers-

ibility was not achieved even after 4 days (Supplementary Fig. S1C), which we interpret as evidence of the involvement of p21 in the establishment of p53-dependent senescence. The same type of analysis was done with Ras-expressing MEFs (Fig. 3D). Again, p53-null/Ras MEFs were insensitive to nutlin, whereas ARF-null/Ras MEFs turned out to be extremely sensitive. It is interesting to note the difference between primary ARF-null and ARF-null/Ras MEFs

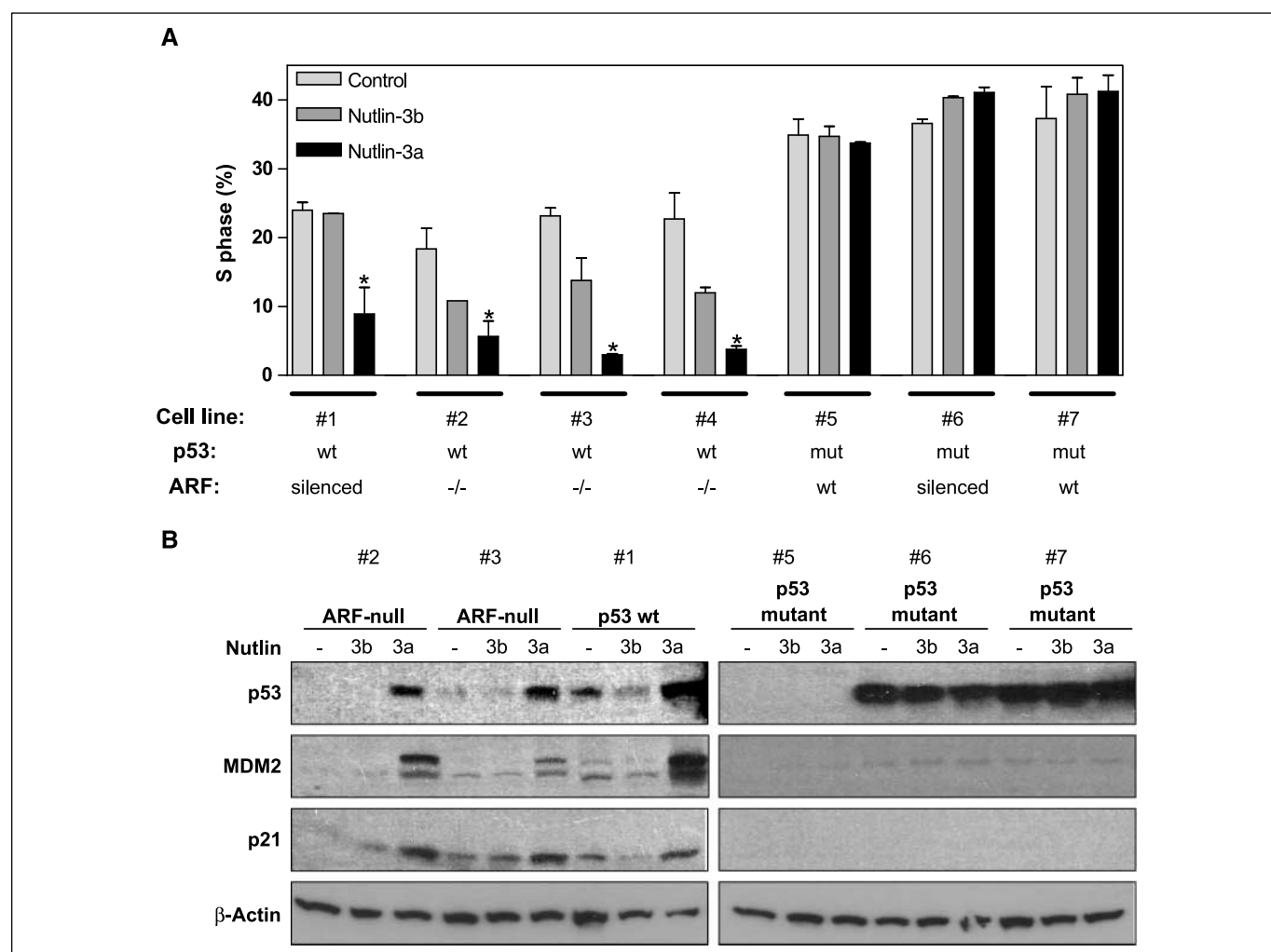


**Figure 3.** Nutlin-3a induces p53-dependent senescence. *A, left*, representative photomicrographs of Ras-infected MEFs of the indicated genotypes after 3 d in the presence of nutlin-3a or nutlin-3b (5  $\mu\text{mol/L}$ ). Note that ARF-null/Ras and p53-null/Ras cells present a typical neoplastic morphology, which in the case of ARF-null/Ras cells is dramatically converted into a senescent morphology by nutlin-3a. *Right*, representative photomicrographs of primary ARF-null MEFs and ARF-null/Ras MEFs stained with SA- $\beta$ Gal after treatment with nutlin-3a (10  $\mu\text{mol/L}$  for 1 wk). *B*, cells of the indicated genotypes, either primary or Ras-infected, were seeded and incubated for 2 wks in the absence of drug (*Control 2w*) or for 1 wk in the presence of the drug (5  $\mu\text{mol/L}$ ) followed by 1 wk in its absence (*Nutlin + 1w recovery*). After incubation, plates were fixed and stained. *C*, primary MEFs were treated with nutlin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) for the indicated periods of time (1, 2, or 4 d) followed by 3 d in the absence of the drug. Cells were counted at the end of the treatment with the drug as well as at the end of the 3-d recovery period. Points, average of two or three independent MEF preparations for each genotype; bars, SE. Representative of a total of three assays. *D*, cells retrovirally transduced with Ras were seeded and incubated in the same manner as in (*C*). All the Ras-infected MEFs used in these experiments were treated with the drug the day after selection (for 3 d with puromycin). The experiment was quantified and repeated as in (*C*).

with regard to the time required to achieve irreversibility. In the case of ARF-null/Ras MEFs, the time for irreversibility was significantly shortened compared with primary ARF-null MEFs (1 day versus 4 days, respectively; see Fig. 3C and D). This differential sensitivity to nutlin likely reflects a cooperative effect between the drug and oncogenic Ras, the latter known to activate p53 by multiple pathways including the generation of DNA damage (47, 48).

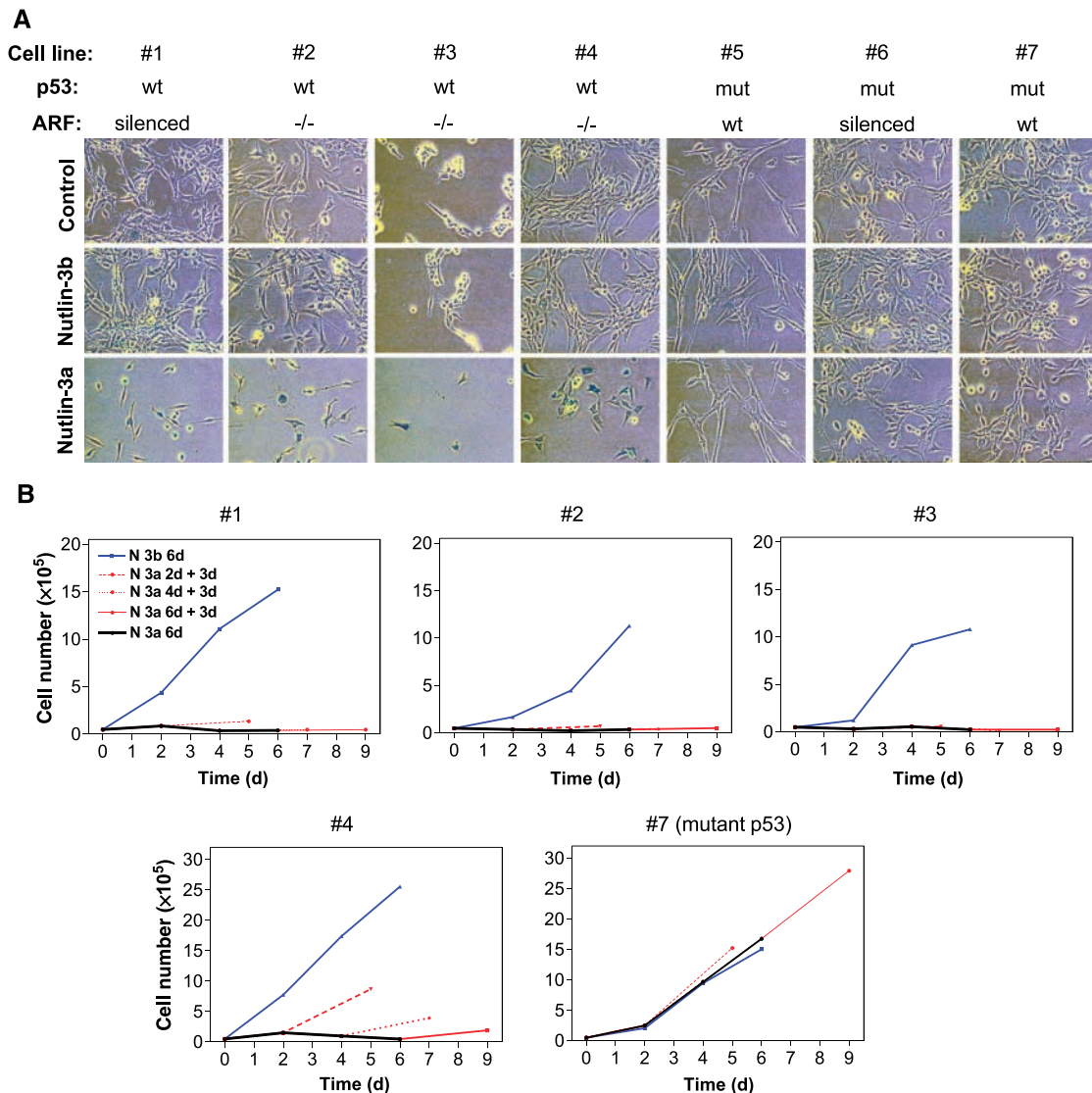
**Nutlin-3a induces p53-dependent senescence in murine fibrosarcoma cell lines.** In the light of the previous results, we wondered whether nutlin-3a would also be able to produce p53-dependent senescence in fibrosarcoma cell lines. For this, we generated primary fibrosarcomas in wt and ARF-null mice by intramuscular injection of a well-known carcinogen, 3-methylcholanthrene. The resulting fibrosarcomas were excised and used to derive fibrosarcoma cell lines. The status of p53 was determined by DNA sequencing to identify point mutations and by Northern blot to identify those cases in which expression is completely lost (not shown); similarly, the status of ARF was determined by Northern blot to identify those fibrosarcoma cell lines that had completely lost the expression of ARF (not shown). Based on these

analyses, we selected a total of seven cell lines (see Fig. 4A). Some of these cell lines retained functional p53 but had lost the expression of ARF (p53<sup>wt</sup>;ARF<sup>silenced</sup>, line 1); others were generated in ARF-null mice and retained functional p53 (p53<sup>wt</sup>;ARF<sup>-/-</sup>, lines 2–4); and, finally, others lacked functional p53 (p53<sup>mut</sup>;ARF<sup>wt</sup>, lines 5 and 7; p53<sup>mut</sup>;ARF<sup>silenced</sup>, line 6). We evaluated the effect of nutlin-3a in these malignant cells and found that the drug selectively induced cell cycle arrest in the p53-proficient cell lines (lines 1–4) but not in the p53-deficient cell lines (lines 5–7; Fig. 4A). As another control, we also obtained fibrosarcoma cell lines from p53<sup>+/-</sup> mice, which in all cases had lost p53 expression while retaining ARF (i.e., p53<sup>-/-</sup>;ARF<sup>wt</sup>), and, as anticipated, these cell lines were completely insensitive to the drug (data not shown). Once more, apoptosis was not observed in any of the cell lines evaluated (data not shown). Activation of the p53 pathway in the p53-proficient cell lines was confirmed by immunoblot analysis (Fig. 4B). After establishing that nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in murine fibrosarcoma cells, we wondered whether this arrest had features of senescence. On exposure to nutlin-3a, the four p53-proficient cell lines (lines 1–4) gave positive



**Figure 4.** Nutlin-3a induces p53-dependent cell cycle arrest in murine fibrosarcoma cell lines. **A**, murine fibrosarcoma cell lines were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (10  $\mu$ mol/L) for 48 h and the percentage of cells in S phase was quantified. Columns, average of two independent determinations; bars, SE. \*, statistically significant. ( $P < 0.05$ ) of nutlin-3a-treated cells with respect to the nontreated controls (Student's *t* test). The status of p53 and ARF for each cell line is indicated at the bottom (see text and part B of this figure). **B**, fibrosarcoma cell lines were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (10  $\mu$ mol/L) for 24 h and the levels of p53, MDM2, and p21 were determined by immunoblot of total protein extracts.





**Figure 5.** Nutlin-3a induces p53-dependent senescence in murine fibrosarcoma cell lines. *A*, representative photomicrographs of fibrosarcoma cells stained with SA- $\beta$ Gal after treatment with nutlin-3a (10  $\mu$ mol/L for 1 wk). *B*, the indicated fibrosarcoma cell lines were treated with nutlin-3a or nutlin-3b (10  $\mu$ mol/L) for the indicated periods of time (2, 4, or 6 d) followed by 3 d in the absence of the drug. Cells were counted at the end of the treatment with the drug as well as at the end of the 3-d recovery period.

staining for SA- $\beta$ Gal, whereas the others (lines 5–7) remained negative and maintained their neoplastic morphology (Fig. 5A). More importantly, we evaluated the irreversibility of the drug-induced arrest and we found that 2 days of treatment was sufficient to produce a complete and irreversible arrest in most of the p53-proficient cell lines (lines 1–3), with the only exception of line 4, which required 4 or 6 days of treatment before undergoing irreversible arrest (Fig. 5B). In summary, we conclude that, in murine fibrosarcoma cell lines, nutlin-3a induces a strong and irreversible arrest with features of senescence and in a manner that is strictly dependent on the functionality of p53.

## Discussion

Here, we have examined the response to nutlin-3a in a variety of genetically defined mouse cells. Primary MEFs, oncogenically

transformed fibroblasts, and murine fibrosarcoma cell lines were all shown to undergo a robust irreversible cell cycle arrest with features of senescence on exposure to nutlin-3a. In all cases, the induction of senescence was strictly dependent on the presence of functional p53. Remarkably, as previously noted (6–8), the proliferation of cells lacking p53 was essentially unaffected even after long periods of exposure (1 week; see Figs. 1A and 2A). The fact that primary p53-null fibroblasts were insensitive to the drug further reinforces the concept that p53 is the only relevant target of nutlin. In the case of oncogenically transformed ARF-null fibroblasts, the exposure time required for irreversible cell arrest (1 day; see Fig. 3E) was significantly shorter than the time required in nontransformed primary ARF-null cells (4 days; Fig. 3D). In the case of fibrosarcoma cell lines, the exposure time required for irreversibility was more variable, but in three of four cell lines, irreversibility was achieved after 2 days of drug treatment (Fig. 5B).

We interpret this as evidence of cooperation between nutlin and oncogenic signaling in p53 activation. These results, derived from direct comparison of primary and oncogenically transformed cells of the same origin, provide a strong support to the notion that MDM2 antagonists are more effective against cancer cells than against normal cells.

It is noteworthy that no apoptosis was observed in any of the cells of fibroblast origin used in our study. It has previously been shown that normal fibroblasts are generally resistant to p53-dependent apoptosis and usually undergo cell cycle arrest and/or senescence after p53 activation. Our results indicate that this property is retained in fibrosarcoma cell lines. Amplification of the *MDM2* gene and overexpression of the protein is particularly frequent (~30%) in soft-tissue sarcomas (1). Moreover, it has been shown that among p53-wt cancer cell lines, those that overexpress MDM2 are the most sensitive to nutlin-3a treatment (49). This observation has been interpreted as evidence that the overexpression of MDM2 is the only alteration in the p53 pathway of

these cells, leaving intact other signaling cascades both upstream and downstream of p53 (49). Determination of the status of MDM2 and p53 is necessary to predict the response of tumors to nutlin-based chemotherapy. In summary, it is reasonable to speculate that tumor senescence may play an important role in the chemotherapy of soft-tissue tumors with MDM2 antagonists like nutlin-3a.

## Acknowledgments

Received 1/16/2007; revised 4/12/2007; accepted 5/3/2007.

**Grant support:** Predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC; A. Efeyan); predoctoral fellowship from the Regional Government of Madrid (A. Ortega-Molina); the Ramon y Cajal Program of the MEC (S. Velasco-Miguel); and predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III) and the Francisco Cobos Foundation (D. Herranz). Work at the laboratory of M. Serrano is funded by CNIO, the MEC (SAF2005-03018), and the European Union (INTACT, PROTEOMAGE).

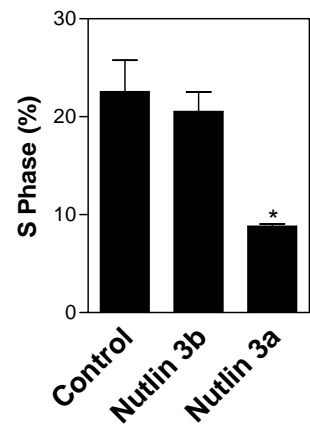
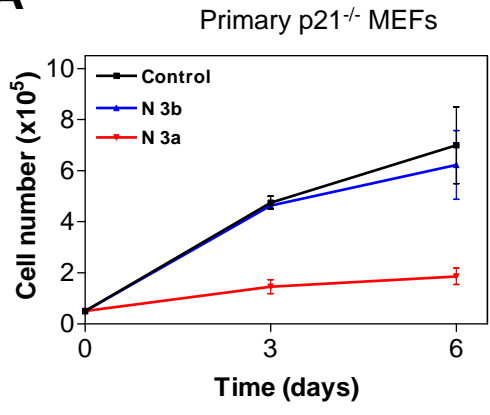
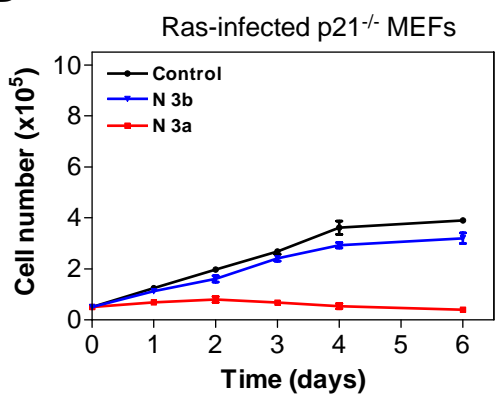
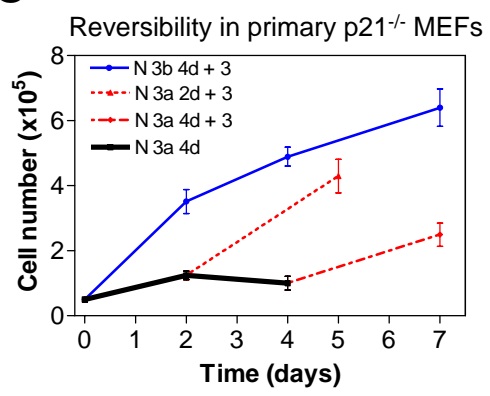
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

## References

- Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:909–23.
- Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 2005;120:7–10.
- Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* 2005;576:22–38.
- Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 2006;443:214–7.
- Efeyan A, Garcia-Cao I, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M. Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 2006;443:159.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844–8.
- Vassilev LT. Small-molecule antagonists of p53–2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 2004;3:419–21.
- Vassilev LT. p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem* 2005;48:4491–9.
- Thompson T, Tovar C, Yang H, et al. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279: 53015–22.
- Mendrysa SM, O'Leary KA, McElwee MK, et al. Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev* 2006;20:16–21.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005;434:864–70.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434:907–13.
- Barbieri E, Mehta P, Chen Z, et al. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2358–65.
- Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, et al. Radio-sensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther* 2006;5:411–7.
- Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107:4109–14.
- Kojima K, Konopleva M, McQueen T, O'Brien S, Plunkett W, Andreff M. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108: 993–1000.
- Secchiero P, Barbarotto E, Tiribelli M, et al. Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006;107:4122–9.
- Carvajal D, Tovar C, Yang H, Vu BT, Heimbrook DC, Vassilev LT. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res* 2005;65:1918–24.
- Aizu W, Belinsky GS, Flynn C, et al. Circumvention and reactivation of the p53 oncogene checkpoint in mouse colon tumors. *Biochem Pharmacol* 2006;72:981–91.
- Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003;63:2705–15.
- Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* 2006;66:2881–4.
- Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:472–6.
- Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1037–46.
- te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62:1876–83.
- Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen SY, Wu DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 2005;65:2795–803.
- Dimiri GP. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* 2005;7:505–12.
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003;22:4212–22.
- Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003;113:703–16.
- Zhang R, Pousovoitov MV, Ye X, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005;8:19–30.
- Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007;445:656–60.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 2007;445:661–5.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997;91:649–59.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994; 4:1–7.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995;377:552–7.
- Pantoja C, Serrano M. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 1999;18:4974–82.
- Palmero I, Serrano M. Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 2001;333:247–56.
- Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, et al. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 2004;18:2736–46.
- Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, et al. “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 2002;21:6225–35.
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative life span of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003;5:741–7.
- Woo RA, Poon RY. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev* 2004;18:1317–30.
- Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85:27–37.
- Wahl GM, Carr AM. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 2001;3:E277–86.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593–602.
- Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:748–53.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307–15.
- Dimiri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363–7.
- Bartkova J, Rezaei N, Linton M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006;444: 633–7.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006;444:638–42.
- Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1888–93.

## LEGEND TO SUPPLEMENTARY FIGURE

**Figure S1. Nutlin-3a induces cell-cycle arrest in the absence of p21.** **A.** (*Left panel*) Primary p21-null MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (5  $\mu$ M) and the number of cells was counted at the indicated days. Data correspond to the average and s.e.m. of two independent MEF preparations per genotype. (*Right panel*) Primary p21-null MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (5  $\mu$ M) for 48 h and the percentage of cells in S-phase was quantified. Values correspond to the average and s.e.m of two independent MEF preparations. Asterisks indicate statistical significant changes with respect to the non-treated controls (Student's t-test). **B.** p21-null/Ras MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (5  $\mu$ M) and the number of cells was counted at the indicated days. Data correspond to the average and s.e.m. of two independent MEF preparations per genotype. **C.** Primary p21-null MEFs were treated with nutlin-3a or -3b (10  $\mu$ M) for the indicated periods of time (2 or 4 days) followed by 3 days in the absence of the drug. Cells were counted at the end of the treatment with the drug, as well as, at the end of the 3-day recovery period. Data correspond to the average and s.e.m. of three independent MEF preparations.

**A****B****C**



# Limited Role of Murine ATM in Oncogene-Induced Senescence and p53-Dependent Tumor Suppression

Alejo Efeyan<sup>1,2</sup>, Matilde Murga<sup>2,3</sup>, Barbara Martinez-Pastor<sup>2</sup>, Ana Ortega-Molina<sup>1</sup>, Rebeca Soria<sup>2</sup>, Manuel Collado<sup>1</sup>, Oscar Fernandez-Capetillo<sup>2\*</sup>, Manuel Serrano<sup>1\*</sup>

**1** Tumor Suppression Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain, **2** Genomic Instability Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

## Abstract

Recent studies in human fibroblasts have provided a new general paradigm of tumor suppression according to which oncogenic signaling produces DNA damage and this, in turn, results in ATM/p53-dependent cellular senescence. Here, we have tested this model in a variety of murine experimental systems. Overexpression of oncogenic Ras in murine fibroblasts efficiently induced senescence but this occurred in the absence of detectable DNA damage signaling, thus suggesting a fundamental difference between human and murine cells. Moreover, lung adenomas initiated by endogenous levels of oncogenic K-Ras presented abundant senescent cells, but undetectable DNA damage signaling. Accordingly, K-Ras-driven adenomas were also senescent in *Atm*-null mice, and the tumorigenic progression of these lesions was only modestly accelerated by *Atm*-deficiency. Finally, we have examined chemically-induced fibrosarcomas, which possess a persistently activated DNA damage response and are highly sensitive to the activity of p53. We found that the absence of *Atm* favored genomic instability in the resulting tumors, but did not affect the persistent DNA damage response and did not impair p53-dependent tumor suppression. All together, we conclude that oncogene-induced senescence in mice may occur in the absence of a detectable DNA damage response. Regarding murine *Atm*, our data suggest that it plays a minor role in oncogene-induced senescence or in p53-dependent tumor suppression, being its tumor suppressive activity probably limited to the maintenance of genomic stability.

**Citation:** Efeyan A, Murga M, Martinez-Pastor B, Ortega-Molina A, Soria R, et al. (2009) Limited Role of Murine ATM in Oncogene-Induced Senescence and p53-Dependent Tumor Suppression. PLoS ONE 4(5): e5475. doi:10.1371/journal.pone.0005475

**Editor:** Mikhail V. Blagosklonny, Ordway Research Institute, United States of America

**Received:** January 8, 2009; **Accepted:** March 27, 2009; **Published:** May 7, 2009

**Copyright:** © 2009 Efeyan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** M.M. and M.C. are supported by a Ramon y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science (MICINN) and by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias to M.M. (PI05945). A.O.-M. is supported by a predoctoral contract from the Government of Madrid. Work in O.F.-C.'s laboratory is supported by the CNIO, Caja Madrid Foundation, the MICINN (RYC-2003-002731, CSD2007-00017 and BFU2005-09429), the Epigenome Network of Excellence (EU-FP6) and the European Research Council. Work at the laboratory of M.S. is funded by the CNIO, the MICINN (SAF2005-03018 and OncoBIO-CONSOLIDER), the Government of Madrid (GsSTEM), the European Union (PROTEOMAGE), the Marcelino Botin Foundation, and the European Research Council. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ofernandez@cnio.es (OFC); mserrano@cnio.es (MS)

† These authors contributed equally to this work.

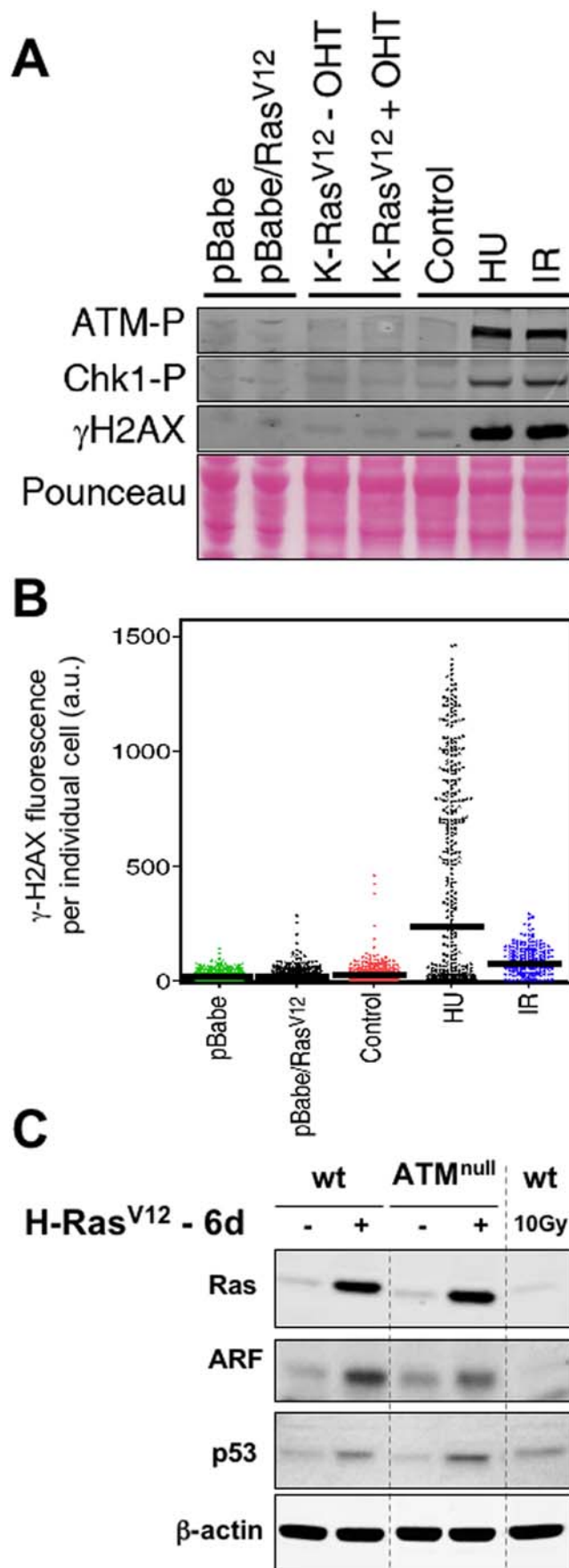
## Introduction

ATM plays an important role in tumor suppression as indicated by the *in vivo* consequences of ATM deficiency both in human and mice. In particular, genetic deficiency of *ATM* in humans is responsible for the ataxia-telangiectasia syndrome characterized by a high susceptibility to both DNA damage and cancer [1,2]. Mice genetically deficient in *Atm* present early onset of thymic lymphomas [3–5], and enhanced susceptibility to a variety of experimentally induced cancers, such as, mammary tumors, skin tumors, B-cell lymphomas, intestinal tumors, and others [6–13].

At a molecular level, ATM is thought to contribute to cancer protection through two main mechanisms. On one hand, ATM acts locally at the sites of double-strand DNA breaks promoting repair [14]; and, on the other hand, ATM activates p53, directly or through its downstream effector kinase CHK2, promoting p53-dependent responses, such as transient cell cycle arrest, senescence or apoptosis [15,16]. Each of the above-mentioned activities of ATM, namely, DNA repair and p53 activation, could contribute independently to tumor suppression. The activation of p53 by

ATM has gained great relevance lately as a general tumor suppressive mechanism after the proposal of a paradigm meant to apply to the majority of cancers [17,18]. According to this model, oncogenic signaling in emerging tumor cells induces *per se* sufficient DNA damage to trigger p53-dependent oncogene-induced senescence. This model is based on two main sets of evidences. First, a variety of human tumors (including bladder, lung, breast and colon tumors, as well as melanoma) at their earliest detectable stages present molecular markers indicative of an ongoing DNA damage response, including phosphorylated ATM [19,20]. Second, inactivation of individual components of the DNA damage response, such as ATM, in cultured human fibroblasts eliminates oncogene-induced senescence and renders these cells permissive to oncogene-driven proliferation [21–23].

Previous work on murine models has put forward an alternative model to explain oncogene-induced p53 activation, being its main features that it is independent of DNA damage and that it places Arf as the critical sensor of oncogenic signaling that mediates p53 activation [24,25]. This model is well supported by *in vivo* genetic evidence in mouse cancer models. For example, Arf is essential for



**Figure 1. Lack of evidence for DNA damage signaling and limited role of Atm in Ras-induced senescence in murine fibroblasts.** **A.** Immunoblots illustrating the phosphorylation status of Atm, Chk1 and H2AX under different conditions: infection of early passage primary MEFs with an empty vector or with H-RasV12 expressing retrovirus (analyzed 6 days post-selection when cells were morphologically senescent), activation of an endogenous K-RasV12 allele with 4-hydroxy-tamoxifen (OHT), and finally controls of DNA damage by replicative stress using hydroxyurea (HU 1 mM, 3 hrs) and by DNA breaks using ionizing radiation (IR 3 Gy, 45 min). **B.** Quantitative immunofluorescence of  $\gamma$ H2AX in single cells from the same populations analysed in part A using high-throughput microscopy. The average intensity of the population is indicated with a bar. Note that upon replicative stress (HU) only the fraction of cells in S-phase activate the DDR, while upon irradiation (IR) the entire population activates the DDR. **C.** Immunoblots of the indicated proteins 6 days after selection of cells retrovirally transduced with H-RasV12. doi:10.1371/journal.pone.0005475.g001

the upregulation of p53 in pre-malignant skin tumors [26], for p53-mediated tumor suppression in lymphomas and sarcomas [27,28], and for oncogene-induced senescence during mammary tumorigenesis [29,30]. Conceivably, this Arf-based model operating during murine tumorigenesis could coexist with an Atm-based model similar to the one proposed in human tumorigenesis. To test this possibility, we have examined genetically in mice the role of Atm in oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression. For this, we have used experimental systems that are well suited to study oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression. In this regard, it is important to clarify that our experiments are not designed to address the well-established role of Atm in tumor suppression through the maintenance of genomic stability by DNA repair.

## Results

### Oncogenic signaling by Ras does not activate Atm in mouse fibroblasts

It has been firmly established in human fibroblasts that oncogenic Ras triggers DNA damage and activation of ATM [21–23]. To test this in murine fibroblasts, we overexpressed oncogenic H-Ras by retroviral transduction in wild-type primary mouse embryo fibroblasts (MEFs) and we also activated with 4-hydroxy-tamoxifen (OHT) an inducible endogenous allele of oncogenic K-Ras [31]. In the case of overexpressed oncogenic H-Ras, cells were analyzed 6 days post-infection when, as expected, cells had a clear senescent morphology. In the case of endogenous oncogenic K-Ras, cells continued proliferating, as previously reported [31] and in agreement with the concept that oncogenic signaling must reach a certain threshold before triggering senescence [29]. Interestingly, neither endogenous nor ectopic Ras signaling were able to activate a DNA damage response as judged by the levels of phosphorylated Atm, Chk1 or H2AX (Fig. 1A). To exclude the possibility that DNA damage signaling could occur in a small subpopulation of Ras-expressing MEFs, we used a sensitive automated immunofluorescence method that allows quantifying the signal intensity of phosphorylated-H2AX ( $\gamma$ H2AX) in individual nuclei. Again, senescent cells overexpressing oncogenic H-Ras did not present evidence of an ongoing DNA damage response, not even in a minority of cells (Fig. 1B). These results suggest that murine fibroblasts undergo Ras-triggered oncogene-induced senescence in the absence of detectable DNA damage signaling. This implies a fundamental difference between human and murine fibroblasts with regard to their susceptibility to activate DNA damage signaling secondary to oncogenic signaling by Ras.

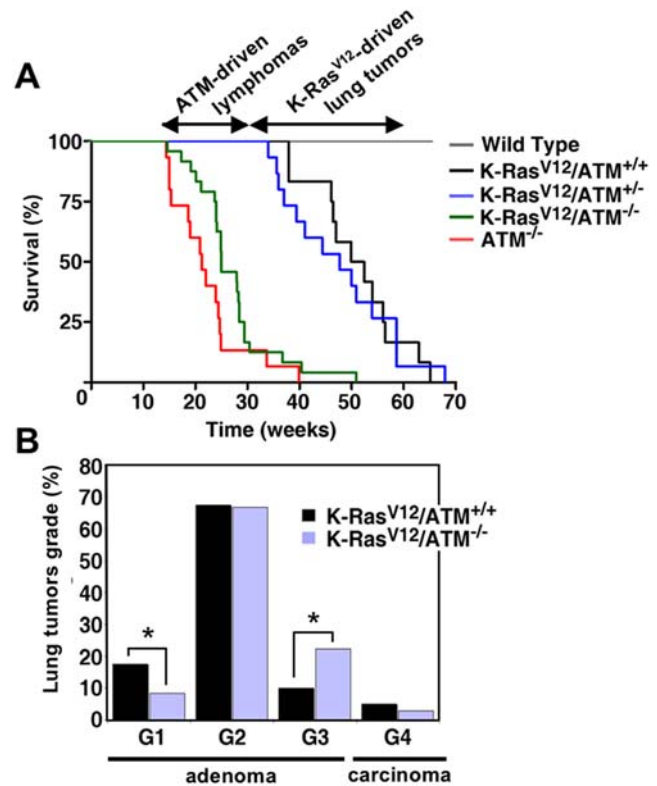
*Atm*-null fibroblasts undergo premature senescence due to their high levels of reactive oxygen species and DNA damage [32,33], thus precluding an analysis of oncogene-induced senescence. Therefore, we restricted our analysis to the ability of oncogenic H-Ras to activate p53 in the absence of *Atm*. Interestingly, both Arf and p53 levels were increased in *Atm*-null MEFs upon overexpression of oncogenic H-Ras, in a manner indistinguishable from wild-type MEFs (Fig. 1C). Moreover, *Atm*-null MEFs were not permissive to H-RasV12-driven proliferation, either alone or in combination with the cooperating oncoprotein E1a (Supplementary Fig. S1). Although, as mentioned above, the lack of permissiveness to oncogene-driven proliferation could be due in part to the intrinsic premature senescence of *Atm*-null MEFs. Together, these results indicate that, in murine fibroblasts, oncogenic Ras signaling activates p53 independently of *Atm*.

### *Atm* is not necessary for senescence in K-RasV12-driven lung adenomas

Lung tumorigenesis induced by endogenous oncogenic K-Ras alleles faithfully recapitulates human lung adenocarcinoma [34], and presents two characteristics of relevance for this study, namely, tumorigenesis is suppressed by p53 [35,36] and it is accompanied by a readily detectable senescence response at the pre-malignant tumor stages [37]. Therefore, this is a well-suited cancer model to evaluate *in vivo* the proposed role of *Atm* as a general barrier to cancer, including lung cancer [19,20], through the activation of oncogene-induced senescence [21,22]. Specifically, we used mice carrying the above-mentioned OHT-inducible endogenous K-RasV12 allele [31]. The oncogenic allele is linked to a LacZ reporter that allows detection of those cells in which the oncogene has been activated by Cre-mediated excision upon OHT. For simplicity, we will refer to these mice as “K-RasV12 mice”. In the following paragraphs, we describe separately the phenotype of *Atm*-heterozygous and *Atm*-nullizygous mice when combined with the K-RasV12 allele activated by OHT at 1 month of age.

Regarding *Atm*-null mice, these mice succumb to thymic lymphomas at an early age [3–5] and we observed that the presence or absence of the K-RasV12 allele did not affect survival in an *Atm*-null context (Fig. 2A). Examination of moribund *Atm*-null mice indicated that all of them, with or without K-RasV12, developed thymic lymphomas with similar histopathological characteristics (not shown). All the thymic lymphomas ( $n = 5$ ) examined from K-RasV12/*Atm*-null animals were positive for LacZ (Supplementary Fig. S2; note that this staining is at pH 7 and does not produce cross-staining with senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, which is measured at pH 6). The above is an interesting observation because expression of the K-RasV12 oncogene was achieved in  $\sim 8\%$  of the cells of the thymus (quantified in scanned photographs; see example in Supplementary Fig. S2). These observations suggest that those thymocytes carrying the activated oncogene have a selective advantage compared to the non-oncogenic ones. We conclude that K-RasV12 has a modest impact on thymic lymphomagenesis driven by *Atm*-loss, providing a selective advantage to the tumoral cells, but without accelerating tumor onset.

In agreement with previous results [31], oncogenic activation of K-Ras in 1-month old mice led to lung carcinogenesis with full penetrance and death between 9 and 16 months of age. Unexpectedly, *Atm*-heterozygosity did not diminish significantly the survival of K-RasV12 mice when compared with their control *Atm* wild-type mice (Fig. 2A; logrank test  $p = 0.79$ ) and histopathological analyses confirmed that death was due to the presence of multiple lung tumors.



**Figure 2. Limited role of *Atm* in Ras-driven murine lung tumorigenesis.** **A.** Kaplan-Meier survival curves of the indicated mice ( $n = 15$  mice for each group). The inducible K-RasV12 allele was activated with OHT when the mice were 1 month old. **B.** Quantification of the different grades of lesions found in the lungs of K-RasV12/*Atm*-wt and K-RasV12/*Atm*-null mice (15 mice per group, and a total of  $n = 121$  and  $n = 108$  lesions, respectively). Asterisks indicate statistical significance of the Fisher's test  $p < 0.05$ . doi:10.1371/journal.pone.0005475.g002

Despite the previous negative data using *Atm*-heterozygous mice, we reasoned that the role of *Atm* in K-RasV12-driven lung tumorigenesis could perhaps be revealed in mice completely deficient in *Atm*. For this, we sacrificed *Atm*-null and *Atm*-wt mice carrying the activated K-RasV12 allele at 5 months of age (4 months post-activation with OHT), when most *Atm*-null mice had not developed yet frank lymphomas but lung tumors were already present. Tumors were counted and grouped in 4 grades, from adenomas (G1–G3) to adenocarcinomas (G4), according to the classification of Johnson *et al.* [35]. Quantification of the number of lesions indicated that the status of *Atm* had no significant impact on tumor incidence (*Atm*-wt: 8.1 lesions/mouse; *Atm*-null: 7.2 lesions/mouse;  $n = 15$  per genotype). Interestingly, histopathological analysis of more than 100 lesions per genotype revealed that *Atm*-nullizygosity had a modest, albeit significant, effect on tumor progression (Fig. 2B). This effect was restricted to the pre-malignant stages with a  $\sim 50\%$  decrease in G1 adenomas and a  $\sim 50\%$  increase in G3 adenomas in *Atm*-null mice compared to their wt controls. At this time of analysis (5 months of age), no significant differences were observed in the incidence of malignant tumors (G4, adenocarcinoma) (Fig. 2B).

Next, we wondered whether, despite the modest effect of *Atm*-deficiency on tumor progression, lung adenomas in *Atm*-null mice had lost the senescence response characteristic of these tumors [37]. Senescence was evaluated by the widely accepted marker senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA $\beta$ Gal; [38]). Remark-

ably, *Atm*-null adenomas presented a senescence response comparable to *Atm*-wt adenomas (Fig. 3A; for whole lung panoramic views see Supplementary Fig. S3). As previously reported [37], adenocarcinomas were negative for SA $\beta$ Gal (see example in Supplementary Fig. S3). Moreover, *Atm*-null adenomas had the same proliferative index as *Atm*-wt adenomas (Fig. 3B), thus indicating that *Atm* is not a barrier for the proliferation of these pre-malignant lesions (apoptosis was essentially undetectable in these lesions, not shown). These negative data prompted us to evaluate whether the K-RasV12-driven adenomas had an ongoing DNA damage response, however, we were unable to detect  $\gamma$ H2AX positive cells in the adenomas (Fig. 3C). Finally, as an additional control, induction of the senescence mediator Arf was readily detected in lung adenomas, but not in carcinomas (Fig. 3D), further reinforcing the idea that oncogene-induced senescence in this model occurs in the absence of DNA damage signaling.

Collectively, we conclude from the above data that senescence at the pre-malignant stages of K-RasV12-driven lung tumorigenesis is not associated to a detectable DNA damage response and it is independent of the status of *Atm*. Accordingly, the absence of *Atm* has a modest impact on the pre-malignant stages of this tumorigenesis model. It is conceivable that loss of function of *Atm* could increase aggressiveness at later stages of tumorigenesis.

### Limited role of *Atm* in protection from chemically-induced fibrosarcomas

To further evaluate the role of *Atm* in a cancer model initiated by DNA damage and under a strong control by p53-mediated tumor suppression, we performed chemical carcinogenesis with the DNA damaging agent 3-methyl-cholanthrene (3MC). This carcinogen generates fibrosarcomas when injected intramuscularly in mice, and tumors carry frequent oncogenic mutations in *K-Ras* or *N-Ras* [28,39–41], together with a high incidence of *p53* inactivation by deletion or point mutation [41,42]. Confirming the relevant role of p53 in the control of these tumors, we have previously shown that the latency of 3MC-fibrosarcomas is highly sensitive to the activity of p53. In particular, mice carrying three functional alleles of the *p53* gene (*p53*-super) have a 50% increase in *p53* gene dosage relative to wild-type mice (*p53*-wt), and this increase in p53 activity translates into a significant delay in the latency of 3MC-fibrosarcomas [43]. To evaluate the role of *Atm* in this *in vivo* assay of p53-mediated tumor suppression, we performed the appropriate crosses to compare *p53*-wt and *p53*-super in an *Atm*-null background. As validation of our genetic system, we observed that the short-term response of p53 to acute DNA damage (3h post-irradiation) was abrogated in the absence of *Atm*, regardless of the *p53* gene dose; and, in the presence of *Atm*, the levels of p53 and p21 were directly associated to the *p53* gene dose (Supplementary Fig. S4). However, unexpectedly, the status of *Atm* did not affect the latency of 3MC-fibrosarcomas neither in a *p53*-wt context nor in a *p53*-super context (Fig. 4A; statistical analyses indicated in the legend). The lack of effect of *Atm* is in contrast to the dramatic effect of Arf, whose deficiency completely abrogates p53-mediated tumor suppression in this cancer model without affecting the short-term response to DNA damage [28] (see also Fig. 4A). Tumors from all the genotypes ( $n = 5$  per genotype) were characterized histologically and all of them showed a strong constitutive DNA damage response ( $\sim 50\%$  of cells positive for  $\gamma$ H2AX), a high mitotic index ( $\sim 50\%$  of cells positive for Ki67), and very low apoptosis ( $< 1\%$  of cells positive for activated caspase-3) (Fig. 4B). Quantification of these markers indicated that their prevalence was not affected by the status of *Atm* (Fig. 4B). The presence of high levels of  $\gamma$ H2AX in *Atm*-null tumors indicates that other kinases from the *Atm* family are responsible for the phosphorylation of H2AX, such as Atr or Dnaphk. Of note,

tumors arising in *Arf*-null mice or in *p53*-super mice showed a modest, albeit significant, decrease in the number of  $\gamma$ H2AX-positive cells (Fig. 4B).

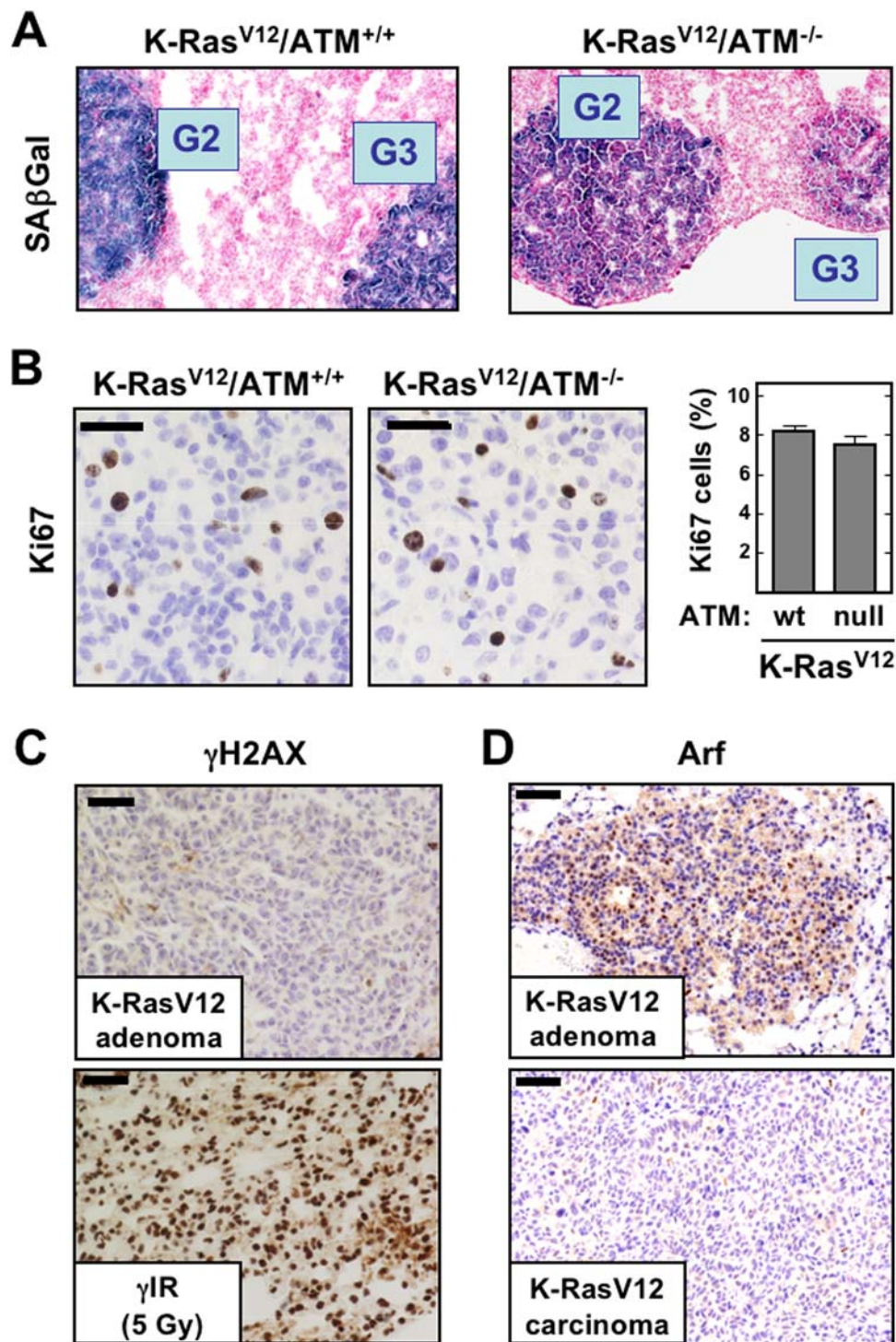
We wondered whether *Atm*-nullizyosity, despite its lack of effect on tumor latency, could relieve the selective pressure to inactivate p53. For this, we examined the functional status of p53 in 3MC-fibrosarcomas and in cell lines derived from these tumors. Inactivation of p53 by point mutation generally renders p53 abnormally stable and readily detectable by immunohistochemistry, and results in undetectable levels of the p53-target p21. The large majority of 3MC-fibrosarcomas produced in *Atm*-wt mice (19/22 = 86%, after combining *p53*-wt and *p53*-super) had an immunohistochemical profile consistent a “p53 mutant” pattern (*i.e.* p53-strongly positive & p21-negative; Table 1, see example in Fig. 5A), thus confirming the strong pressure to inactivate p53 in this cancer model. Importantly, a similar situation was observed in the 3MC-fibrosarcomas generated in *Atm*-null mice, where the majority (14/18 = 78%) also had a “p53-mutant” pattern, including those generated in a *p53*-super context (Table 1 and Fig. 5A). In contrast to this and in agreement with our previous data [44], tumors generated in *Arf*-null mice presented a “p53 functional” staining pattern (*i.e.* p53-weakly positive & p21-positive; Table 1, Fig. 5A and see Supplementary Fig. S5 for a nutlin-sensitivity assay), thus confirming that *Arf*-deficiency, in contrast to *Atm*-deficiency, completely relieves the pressure to inactivate *p53*.

To further substantiate the above observations, we examined the functionality of p53. The cancer cell lines derived from wt or *Atm*-null mice had constitutively high levels of p53 and essentially undetectable levels of p21 both before and after ionizing radiation (Fig. 5B, lanes 1–10), compatible with a mutant p53 status. We wondered whether the 3MC-fibrosarcomas produced in wt mice retained a normal response to DNA damage. As shown in Fig. 5B, the phosphorylation of Chk2, *Atm* and H2AX shortly after ionizing radiation was normal in representative lines from wt mice (lanes 1,2,7–10) but, as expected, Chk2 phosphorylation was absent in the fibrosarcomas from *Atm*-null mice (lanes 3–6). Therefore, 3MC-fibrosarcomas derived from wild-type mice retain an apparently functional *Atm* and DNA damage response, and *Atm*-deficiency does not relieve the pressure to inactivate p53. The cancer cell lines derived from *Arf*-null mice also had a normal DNA damage response (Fig. 5B, lanes 11–14), but in sharp contrast with those fibrosarcomas from wt or *Atm*-null mice, *Arf*-null fibrosarcomas conserved a functional p53/p21 response to DNA damage (lanes 11–14).

Finally, to seek evidence for an impact of *Atm*-deficiency in this cancer model, we examined the level of genomic instability in the different 3MC-fibrosarcoma cell lines described above. Consistent with the well-established role of p53 in genomic stability, those fibrosarcomas lacking functional p53 had high levels of chromosomal fusions (Table 2). To dissociate the impact of p53 and *Atm* on genomic stability, we grouped the *Atm*-null cancer cell lines into those with mutant p53 and those with functional p53 (treatment with the MDM2 inhibitor nutlin confirmed the presence or absence of functional p53, see Supplementary Fig. S6). Interestingly, cancer cells deficient in *Atm*, but not in p53, had significantly higher levels of chromosomal instability, particularly fusions and aneuploidies, than the comparable *Arf*-null;p53-functional cells (Table 2). In summary, these observations indicate that the absence of *Atm* increases genomic instability, but it does not relieve the pressure to inactivate p53 during cancer development.

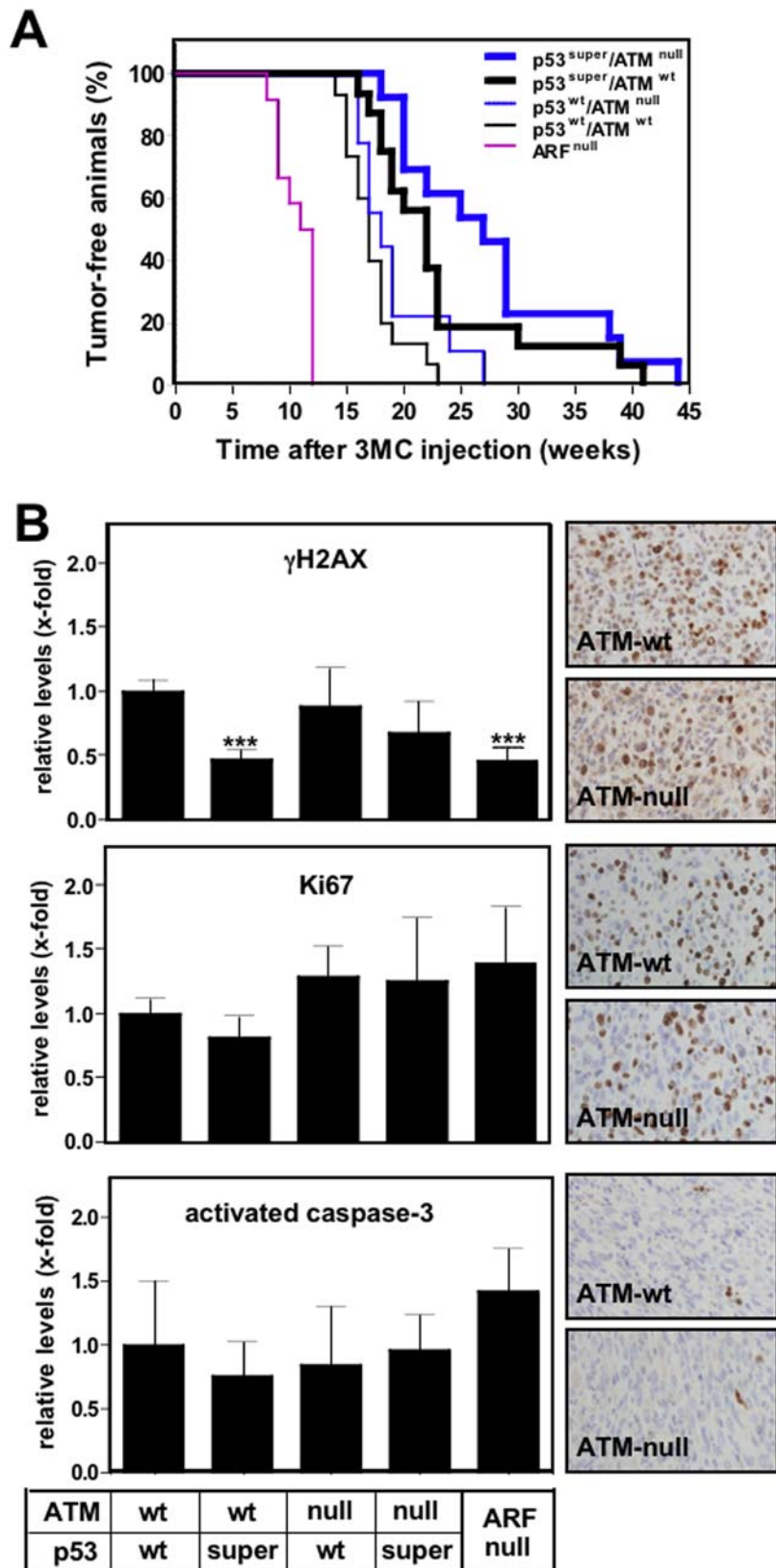
Collectively, we conclude that *Atm* plays a minor role in 3MC carcinogenesis. In the absence of *Atm*, genomic instability is





**Figure 3. Lack of evidence for DNA damage signaling and limited role of Atm in senescent murine lung tumors.** **A.** Representative stainings of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA $\beta$ Gal) in lung cryosections from K-RasV12/Atm-wt and K-RasV12/Atm-null mice. The grade of the tumor (G2 or G3) is indicated. See Supplementary Fig. S3 for panoramic views, including adenocarcinomas (G4, which are negative for SA $\beta$ Gal). **B.** Examples of Ki67 stainings of lung adenomas from the indicated mouse genotypes and quantification (adenomas  $n=4$  for each genotype). Values correspond to the average and standard deviation. **C.** Lack of detectable  $\gamma$ H2AX staining in K-RasV12-driven lung adenomas. The bottom panel shows a positive control of the lung from an irradiated wild-type mouse (5 Gy, 45 min post-IR). **D.** Expression of Arf during K-RasV12-driven lung tumorigenesis is specifically associated to the pre-malignant stages (adenomas, top), but not to the malignant ones (adenocarcinomas, bottom). Note that some cells in the adenoma are Arf-positive and others are Arf-negative, consistent with the concept that not all the tumor cells of these lesions are senescent, and indeed a fraction of cells are proliferating, as shown in part B.

doi:10.1371/journal.pone.0005475.g003



**Figure 4. Limited role of *Atm* in p53-mediated tumor suppression and DNA damage response in chemically-induced fibrosarcomas.** **A.** Mice of the indicated genotypes, wt (n=15), *p53*-super (n=16), *Atm*-null (n=9), *p53*-super/*Atm*-null (n=13) and *Arf*-null (n=12), were injected intramuscularly with 3-methyl-cholanthrene (3MC) and tumour development was monitored. Kaplan-Meier tumour-free curves were obtained and statistical significant differences (logrank test) were found for wt vs. *p53*-super ( $p<0.005$ ), *Atm*-null vs. *p53*-super/*Atm*-null ( $p<0.001$ ) and *Arf*-null vs. wt ( $p<0.0001$ ). No significant differences were found for wt vs. *Atm*-null ( $p=0.11$ ), or *p53*-super vs. *p53*-super/*Atm*-null ( $p=0.18$ ). **B.** Quantification of

the persistent DNA damage response ( $\gamma$ H2AX), proliferation (Ki67), and apoptosis (activated caspase-3) in 3MC-fibrosarcomas generated in mice of the indicated genotypes. Quantifications are relative to the 3MC-fibrosarcomas in wild-type mice. Values correspond to the average and standard deviation ( $n=5$  per genotype). Examples of the immunostainings are shown in the panels at the right.  
doi:10.1371/journal.pone.0005475.g004

favorable, yet neither the DNA damage response nor p53-mediated tumor suppression are affected.

## Discussion

The role of ATM in tumor suppression is solidly established and attributed, at least in part, to its well-known function in DNA damage repair. In addition to its function in guarding the genome, ATM has been recently proposed to act as a general tumor suppressor through its ability to activate p53 in response to oncogenic stress and the subsequent induction of oncogene-induced cellular senescence [17,18]. This model is mainly based on human cultured fibroblasts where ATM plays an essential role in oncogene-induced senescence [21–23]. In this work, we have attempted to find *in vivo* supporting evidence for the role of ATM in p53-dependent tumor suppression and in oncogene-induced senescence using murine experimental systems, namely, Ras-induced senescence in mouse embryo fibroblasts (MEFs), Ras-induced senescence during lung tumorigenesis, and chemically-induced fibrosarcomas.

A first unexpected observation was the absence of a detectable DNA damage response upon ectopic overexpression of oncogenic H-Ras in MEFs, under conditions that resulted in upregulation of Arf, stabilization of p53, and acquisition of a fully senescent morphology. Given the absence of a detectable DNA damage response elicited by oncogenic H-Ras, it was not surprising that the stabilization of p53 in response to the oncogene was not affected by the absence of Atm. Conceptually similar observations were made in a more physiological model of oncogene-induced senescence in which an inducible endogenous K-RasV12 allele drives the development of adenomas (pre-malignant) and adenocarcinomas (malignant), being characterized the adenomas by a strong senescence response [37]. Again, as in the case of MEFs, we could not detect evidence of persistent DNA damage signaling in the K-RasV12-driven adenomas, which were invariably senescent as shown in [37] (Fig. 3C). Consistently with this, *Atm* deficiency did not ablate the senescent response characteristically present in lung adenomas. Interestingly, however, the absence of *Atm* had a modest, albeit significant, effect in the degree of progression of adenomas. In contrast to these data, ablation of *Arf* strongly accelerates lung tumorigenesis driven by oncogenic K-RasV12

[45], and it eliminates oncogenic Ras-induced senescence during mammary tumorigenesis [29,30]. Together, these results indicate that oncogene-induced senescence in murine fibroblasts and lung epithelial cells is not associated to an ongoing DNA damage response and, therefore, activation of p53 and establishment of senescence occur independently of Atm.

Based on the above data, we focused on a murine cancer model initiated by a DNA damage agent (3-methyl-cholanthrene or 3MC), known to be highly sensitive to the activity of p53 [43], and accompanied by a persistent DNA damage response (see Fig. 4B). However, the absence of *Atm* did not impact on the kinetics of tumor development, even under conditions able to detect a 1.5-fold difference in p53 activity. Histopathological analyses of these tumors indicated that the absence of *Atm* did not decrease the persistent DNA damage response, which must be signaled by other kinases of the Atm family, such as Atr or Dnkap. Importantly, the absence of Atm did not relieve the strong selective pressure to inactivate p53, further confirming that the tumor suppressor activity of p53 in this cancer model is not regulated by Atm. These results are in agreement with previous reports that also failed to detect an impact of Atm on p53-mediated tumor suppression in murine brain and skin cancers [46,47]. The absence of effect of Atm on p53-dependent tumor suppression is in sharp contrast with a number of reports where the absence of Arf essentially eliminates p53-mediated tumor suppression and completely alleviates the selective pressure to inactivate p53 in lymphomas, sarcomas and skin tumors [26–28,48,49]. Moreover, the 3MC-fibrosarcomas originated in *Arf*-null mice retained a functional response to DNA damage, as judged by the phosphorylation of Atm and H2AX, as well as, by the stabilization of p53 and the induction of p21 upon irradiation (Fig. 5B). In summary, in this cancer model initiated by a DNA damage agent and associated to persistent DNA damage, the absence of *Atm* does not have a detectable effect on DNA damage signaling or on p53-dependent tumor suppression. Finally, and interestingly, we found that *Atm*-null fibrosarcomas were characterized by high levels of chromosomal instability (Table 2), thus testifying to the known role of Atm in genome stability.

It is critically important to emphasize that our data do not negate a tumor suppressor role for ATM, which is solidly established both in human and mice (see Introduction), but question the generality of the model proposed for ATM as a critical mediator of p53-activation and senescence in response to oncogenic signaling [17,18]. This model is mainly based on the behavior of human fibroblasts *in vitro* and it does not seem to apply to the three murine experimental systems analyzed here, namely, oncogene-induced senescence in fibroblasts and during lung tumorigenesis, and p53-mediated tumor suppression during carcinogenesis initiated by a DNA damage agent. By large, the molecular biology of human and murine cancer seem to follow the same mechanistic paradigms, however, it is conceivable that ATM is an exceptional case playing a major tumor suppression role in human cancer, but not in murine cancer.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Mice were treated in accordance with the Spanish Laws and the Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research.

**Table 1.** Immunohistochemical analysis of 3MC-fibrosarcomas.

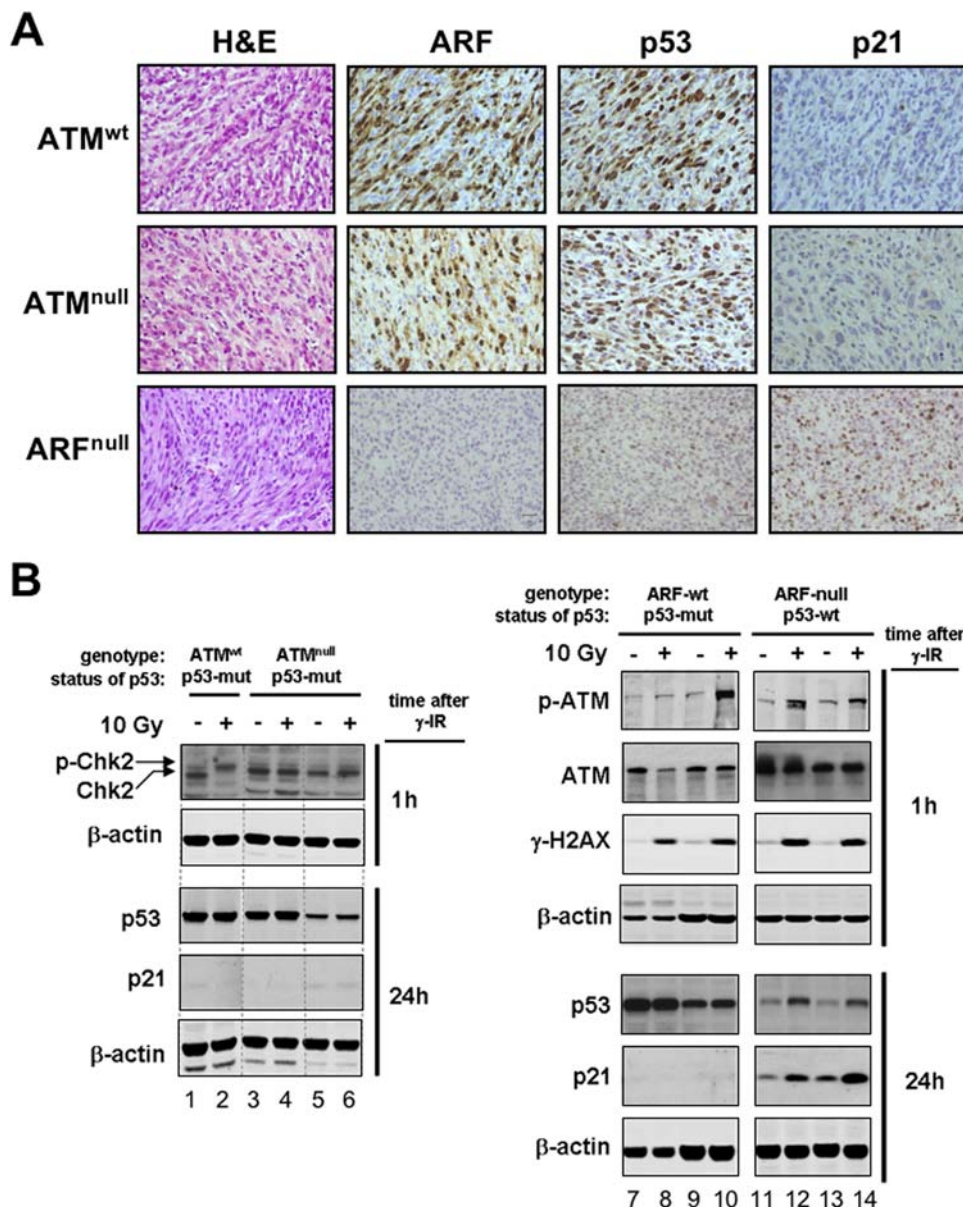
| Genotype                            | ARF positive      | p53 positive (mutant p53) <sup>a</sup> | p21 positive (active p53) <sup>a</sup> |
|-------------------------------------|-------------------|--|--|
| <i>Atm</i> -wt; <i>p53</i> -wt      | 10/10             | 9/10                                   | 1/10                                   |
| <i>Atm</i> -wt; <i>p53</i> -super   | 12/12             | 10/12                                  | 1/12                                   |
| <i>Atm</i> -null; <i>p53</i> -wt    | 7/7               | 7/7                                    | 0/7                                    |
| <i>Atm</i> -null; <i>p53</i> -super | 8/11 <sup>b</sup> | 7/11                                   | 3/11                                   |
| <i>Arf</i> -null                    | n.a.              | 1/9                                    | 7/9                                    |

<sup>a</sup>Most tumors strongly positive for p53, lacked p21 expression (reflecting a non-functional mutant p53); and, tumors negative or weakly positive for p53, had detectable p21 (reflecting a functional p53)

<sup>b</sup>The few tumors that lacked Arf were negative or weakly positive for p53 (reflecting a functional p53)

doi:10.1371/journal.pone.0005475.t001





**Figure 5. Absence of *Atm* does not relieve the selective pressure to inactivate p53 during chemical carcinogenesis. A.** Representative images of 3MC-fibrosarcomas immunostained for Arf, p53 and p21 (see also Table 1). The upper and middle rows are representative of the large majority of fibrosarcomas developed in wild-type (upper) and *Atm*-null (middle) mice, which are consistent with a mutant p53 (*i.e.* strongly positive for p53 and negative for p21). The lower row is representative of the fibrosarcomas developed in *Arf*-null mice, which are consistent with a functional p53 (*i.e.* very weakly positive for p53 and positive for p21). **B.** Examples of cancer cell lines established from 3MC-fibrosarcomas (each line derives from an independent fibrosarcoma). The genotype of the mice where the 3MC-fibrosarcomas were generated is indicated, as well as, the status of p53 as determined by a nutlin-sensitivity assay (see Supplementary Figures S5 and S6). Cell lines were exposed to 10 Gy and protein extracts were obtained 1h and 24h after irradiation. The levels of the indicated proteins were determined by immunoblotting using β-actin as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0005475.g005

### Cells and mice

*K-RasV12*; *Atm*-null mice were obtained by crossing transgenic mice carrying a tamoxifen-inducible Cre and a Cre-inducible *K-RasV12* endogenous allele [31] with *Atm*-null mice [4]. Activation of the Cre-inducible *K-RasV12* was performed in 1-month old mice by injection of tamoxifen as previously described [31]. *Arf*-null mice [50] and *p53*-null mice [51] were previously described. Mice were housed under standard conditions at the serupathogen free facility of the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO). Upon signs of morbidity or when required, mice were euthanized. Mouse embryo fibroblasts (MEFs) were obtained

from E13.5 embryos as previously described [52] and grown in Dulbecco's Minimum Essential Media (DMEM, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Hyclone, Logan, UT). MEFs were grown in 3% oxygen to minimize premature senescence of *Atm*-deficient cells. In all experiments with MEFs, low passage (less than 3 passages) MEFs were used.

### Oncogene-induced senescence in MEFs

Cells were retrovirally transduced following standard procedures using constructs based on the vector pBabe-puro (Fig. 1A) or pLPC-puro (Fig. 1C and Suppl. Fig. S1) and expressing oncogenic



**Table 2.** Chromosomal instability in 3MC-fibrosarcoma cell lines.

| Genotype of mouse             | Status of p53 <sup>a</sup> | Fusions (% of chromosomes) | Aneuploidies (% of metaphases) <sup>c</sup> | Breaks (% of chromosomes) | Metaphases analyzed (cell lines analyzed) |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|---|---------------------------|---|
| <i>Atm</i> -wt                | mutant                     | 1.2±2.4                    | 56±20                                       | 1.4±1.8                   | 294 (5)                                   |
| <i>Atm</i> -null              | mutant                     | 2.4±12.0                   | 85±22                                       | 14.0±66.0                 | 111 (2)                                   |
| <i>Atm</i> -null <sup>b</sup> | functional                 | 1.5±7.5 <sup>d</sup>       | 74±34 <sup>d</sup>                          | 1.9±7.5                   | 109 (2)                                   |
| <i>Arf</i> -null              | functional                 | 0.09±0.41 <sup>d</sup>     | 31±13 <sup>d</sup>                          | 1.0±6.0                   | 287 (5)                                   |

<sup>a</sup>The functional status of p53 in the fibrosarcoma cell lines was determined by examining the levels of p53 and p21 upon  $\gamma$ IR, both by immunohistochemistry (Fig. 5A) and immunoblotting (Fig. 5B), as well as, by their susceptibility to cell cycle arrest upon treatment with nutlin (Supplementary Fig. S5 and S6).

<sup>b</sup>These *Atm*-null lines with functional p53 correspond to a minority of the 3MC-fibrosarcomas produced in *Atm*-null mice, which by large have mutant p53 (see Table 1 and Fig. 5B). Only two lines were obtained that retained functional p53 (Supplementary Fig. S6): one derived from an *Atm*-null;p53-super mouse and the other one from an *Atm*-null;p53-wt mouse.

<sup>c</sup>Aneuploidies correspond to metaphasases with chromosome numbers different from 40±1 or 80±2.

<sup>d</sup>Statistical comparison (t-test) between *Atm*-null(p53-functional) and *Arf*-null(p53-functional): metaphases with fusions,  $p=0.04$ ; aneuploid cell lines,  $p=0.06$ .

doi:10.1371/journal.pone.0005475.t002

Ras (H-*Ras*V12) or E1a/IRES/H-*Ras*V12 [53]. Infected cells were selected with 1.5  $\mu$ g/ml puromycin for 2–3 days as described [54]. Cell extracts were prepared 6 days post-selection. MEFs carrying a tamoxifen-inducible K-*Ras*V12 allele were also used [31]. Quantification of DNA damage by quantitative immunofluorescence of single cells was performed as described [55]. Briefly, cells were grown on  $\mu$ CLEAR-bottom 96-well dishes (Greiner Bio-One) and analyzed on a BD Pathway 855 BioImager (Beckton Dickinson). Image analysis was performed with the AttoVision software (Beckton Dickinson). All the images for quantitative analyses were acquired under nonsaturating exposure conditions.

### Tumor induction and establishment of fibrosarcoma cell lines

For fibrosarcomagenesis, 2–4 mo old animals were injected intramuscularly in one of the rear legs with 1 mg of 3-methylcholanthrene (Sigma) dissolved in corn oil, and tumor development was followed, as previously described [43]. Mouse fibrosarcoma cell lines were obtained from tumors as previously described [43]. Briefly, the tumor mass was rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) with antibiotics and then minced with razor blades into small pieces that were placed in 100-mm diameter dishes in the presence of DMEM/10% FBS. Cell lines were established from tumor outgrowths after four to six passages. Cells were plated in 3.5-cm diameter plates and, the following day, were irradiated with 10 Gy at 1.94 Gy/min in a Shepherd Mark 1–30 irradiator.

### Metaphase analyses

Exponentially growing cells were incubated with 0.1  $\mu$ g/ml colcemide (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) for 2 h at 37°C and then fixed in methanol:acetic acid (3:1). Metaphases were spread in acetic acid 45%. Chromosome number, fragments and fusions were analyzed in at least 50 metaphases per cell line.

### Immunoblots and immunohistochemistry

Whole-cell protein extracts were obtained using RIPA buffer. For immunoblotting, we used the following primary antibodies: anti-p53 (NCL-p53-CM-5p, Novocastra; and 1C12, Cell Signaling Technology), anti-p21 (p21-C-19-G, Santa Cruz Biotechnology), anti-total-Atm (NB100-220, Novus Bio), anti-phospho-Ser1981-Atm (Atmp1981, 200-301-400, Rockland Biochemicals), anti H-Ras (clone 18, BD Biosciences), anti-Arf (Ab80-100, Abcam; and 5-C3-1, Santa Cruz Biotechnology), anti-Chk2 (05-649, clone 7, Upstate), anti-phospho-Chk1 (2341, Cell Signaling Technology),

anti- $\gamma$ H2AX (05-636, Millipore), and anti- $\beta$ -actin (clone AC-15, Sigma). Protein levels were visualized after incubation with the appropriate secondary antibodies conjugated with HRP followed by detection with ECL Plus (Amersham) or conjugated with fluorescein followed by detection with Odyssey (Li Cor Biosciences).

For immunohistochemistry, formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples were incubated with the following antibodies: anti-Ki67 (TEC-3, DAKO), anti- $\gamma$ H2AX (clone JBW301, Upstate), anti-Caspase 3 active (R&D Systems), anti-Arf (5-C3-1, Santa Cruz Biotechnology), anti-p53 (NCL-p53-CM-5p, Novocastra), and anti-p21 (p21-C-19-G, Santa Cruz Biotechnology). For quantification, 10 high power fields (40 $\times$ ) were randomly chosen under the microscope and the total number of positive cells was counted for each tumor.

**SA- $\beta$ -Galactosidase activity.** SA- $\beta$ -Galactosidase activity was evaluated using the “Senescence- $\beta$ Gal Staining Kit” (Cell Signaling Technology) following the manufacturer’s instructions in OCT-embedded lung sections. Stained slides were subsequently stained with nuclear fast red.

### Supporting Information

**Figure S1** *Atm*-deficiency does not render MEFs permissive to H-RasV12-driven proliferation. A. Primary mouse embryo fibroblasts (MEFs) of the indicated genotypes were retrovirally transduced with H-RasV12 and 2000 cells were seeded in 10-cm diameter plates. After 2 weeks, cells were fixed and stained and colonies were counted. All incubations were done in low oxygen (3%). Top, quantification; bottom, representative plates. B. Same as in A but after retroviral transduction of cells with oncoviral protein E1a and H-RasV12.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005475.s001 (0.34 MB TIF)

**Figure S2** Expression of K-RasV12 provides a selective advantage for T-lymphomagenesis in *Atm*-null mice. Left, representative LacZ staining of the thymus 2 days after activation of the K-RasV12 allele by tamoxifen (the oncogenic allele is linked with an IRES to LacZ). Quantification indicates that approximately 8% of the cells are LacZ-positive. Right, representative image of a thymic lymphoma from a K-RasV12;*Atm*-null mouse. A total of 5 lymphomas were analyzed and all of them were strongly positive for LacZ.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005475.s002 (0.20 MB TIF)

**Figure S3** In vivo senescence in K-RasV12-driven lung adenomas is not affected by the status of *Atm*. Complete lung

sections at low magnification stained with senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA $\beta$ Gal) and nuclear fast red. Slides were examined blindly by an expert pathologist, Dr. Marta Cañamero (CNIO), who determined the grade of the tumors. All the adenomas (grades G1 to G3) were positive for SA $\beta$ Gal. The lung in the right side contains an adenocarcinoma that is shown at high magnification below. Adenocarcinomas (grade 4) presented a very weak SA $\beta$ Gal staining.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005475.s003 (0.43 MB TIF)

**Figure S4** The short-term response of the lung to DNA damage is eliminated in the absence of Atm and it is enhanced in the presence of an extra allele of p53. Mice of the indicated genotypes were irradiated and protein extracts were prepared from their lungs 3 h post-IR. The antibody used for phospho-Ser18-p53 was from Cell Signaling (#9284S).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005475.s004 (0.12 MB TIF)

**Figure S5** Arf-deficiency relieves the selective pressure to inactivate p53 in 3MC-fibrosarcomas (nutlin-sensitivity assay). Fibrosarcoma cell lines obtained from the wt or Arf-null mice were treated with 10  $\mu$ M of the active enantiomer of nutlin (nutlin-3a, N3a) or with the inactive enantiomer (nutlin-3b, N3b). Nutlin activates p53 by inhibiting MDM2. After 48 h, cells were fixed and the proportion of S-phase cells was determined by flow cytometry. All the fibrosarcoma cell lines derived from wt mice did

not respond to N3b, thus indicating that p53 was not functional; in contrast, all but one cell lines derived from Arf-null mice responded to N3b by strongly decreasing proliferation.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005475.s005 (0.07 MB TIF)

**Figure S6** Identification of Atm-null fibrosarcoma cell lines retaining functional p53 (nutlin-sensitivity assay). The large majority of 3MC-fibrosarcomas from Atm-null mice lacked functional p53 (see Table 1), however, two Atm-null cell lines were identified that retained a functional p53. These cell lines, #2 and #3 in the figure, responded to 10  $\mu$ M nutlin (racemic mixture) by undergoing cell cycle arrest as measured by flow cytometry 48 h after treatment.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005475.s006 (0.06 MB TIF)

## Acknowledgments

We are indebted to Mariano Barbacid for his kind gift of the K-RasV12 mice, to Marta Cañamero for the pathological analyses, and to Maribel Muñoz for excellent mouse colony management.

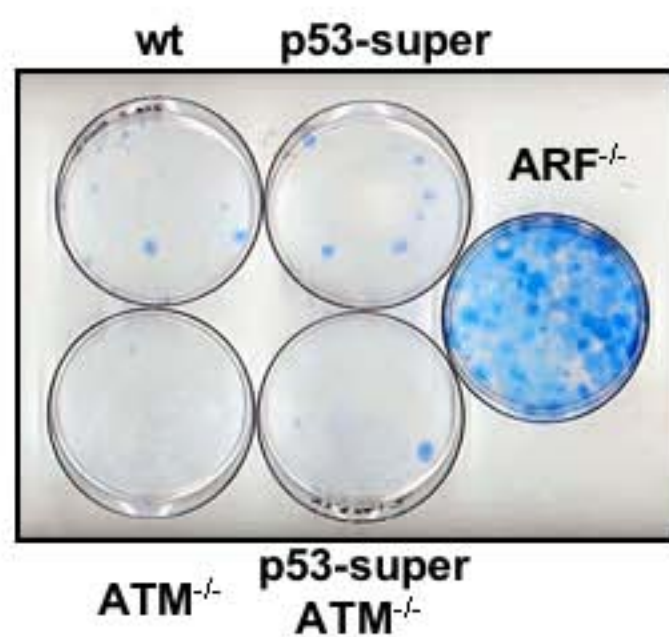
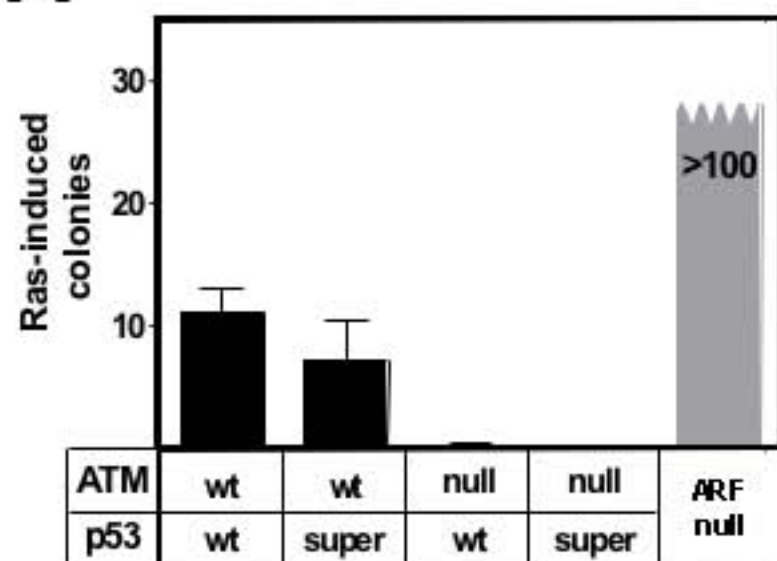
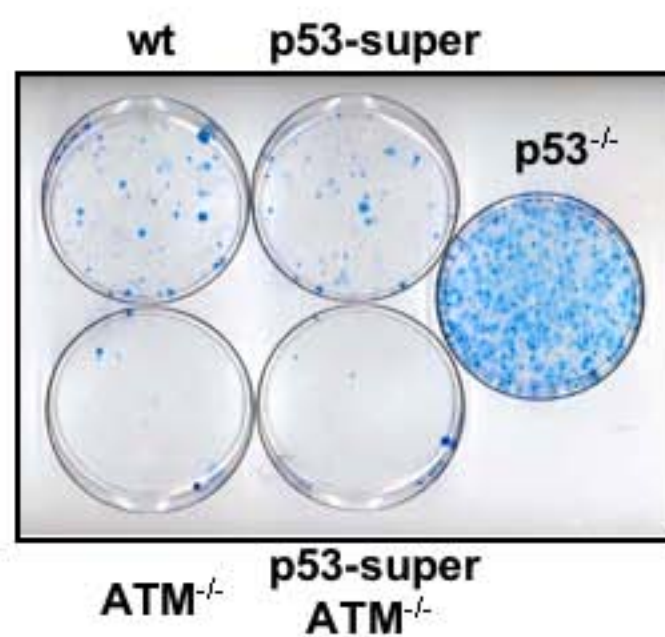
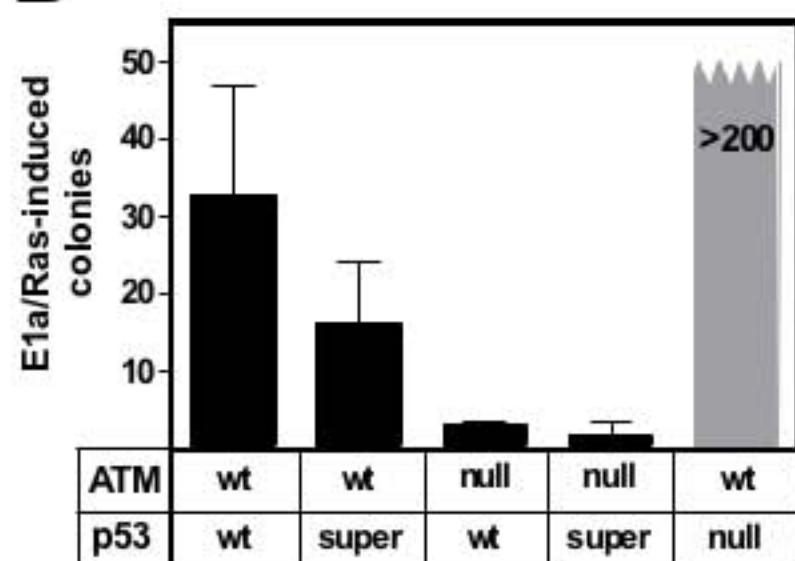
## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AE MM OFC MS. Performed the experiments: AE MM BMP AOM RS MC. Analyzed the data: AE MM OFC MS. Wrote the paper: OFC MS.

## References

- Frappart PO, McKinnon PJ (2006) Ataxia-telangiectasia and related diseases. *Neuromolecular Med* 8: 495–511.
- Mavrou A, Tsangaris GT, Roma E, Kolialexi A (2008) The ATM gene and ataxia telangiectasia. *Anticancer Res* 28: 401–405.
- Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, et al. (1996) Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* 10: 2411–2422.
- Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, et al. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86: 159–171.
- Elson A, Wang Y, Daugherty CJ, Morton CC, Zhou F, et al. (1996) Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13084–13089.
- Bowen TJ, Yakushiji H, Montagna C, Jain S, Ried T, et al. (2005) Atm heterozygosity cooperates with loss of Brca1 to increase the severity of mammary gland cancer and reduce ductal branching. *Cancer Res* 65: 8736–8746.
- Umesako S, Fujisawa K, Iiga S, Mori N, Takahashi M, et al. (2005) Atm heterozygous deficiency enhances development of mammary carcinomas in p53 heterozygous knockout mice. *Breast Cancer Res* 7: R164–170.
- Lu S, Shen K, Wang Y, Santner SJ, Chen J, et al. (2006) Atm-haploinsufficiency enhances susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors. *Carcinogenesis* 27: 848–855.
- Pusapati RV, Rounbehler RJ, Hong S, Powers JT, Yan M, et al. (2006) ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1446–1451.
- Maclean KH, Kastan MB, Cleveland JL (2007) Atm deficiency affects both apoptosis and proliferation to augment Myc-induced lymphomagenesis. *Mol Cancer Res* 5: 705–711.
- Reimann M, Loddenkemper C, Rudolph C, Schildhauer I, Teichmann B, et al. (2007) The Myc-evoked DNA damage response accounts for treatment resistance in primary lymphomas in vivo. *Blood* 110: 2996–3004.
- Kwong LN, Weiss KR, Haigis KM, Dove WF (2008) Atm is a negative regulator of intestinal neoplasia. *Oncogene* 27: 1013–1018.
- Shen KC, Heng H, Wang Y, Lu S, Liu G, et al. (2005) ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development. *Cancer Res* 65: 8747–8753.
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28: 739–745.
- O'Driscoll M, Jeggo PA (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7: 45–54.
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, et al. (2005) DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120: 497–512.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J (2007) DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26: 7773–7779.
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319: 1352–1355.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, et al. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434: 864–870.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, et al. (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434: 907–913.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633–637.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444: 638–642.
- Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G (2007) The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21: 43–48.
- Efeyan A, Serrano M (2007) p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6: 1006–1010.
- Evan GI, d'Adda di Fagagna F (2009) Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev* 19: 25–31.
- Kelly-Spratt KS, Gurley KE, Yasui Y, Kemp CJ (2004) p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways. *PLoS Biol* 2: E242.
- Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI (2006) The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 443: 214–217.
- Efeyan A, Garcia-Cao I, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M (2006) Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 443: 159.
- Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, Boxer RB, Moody SE, et al. (2007) Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9: 493–505.
- Swarbrick A, Roy E, Allen T, Bishop JM (2008) Id1 cooperates with oncogenic Ras to induce metastatic mammary carcinoma by subversion of the cellular senescence response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5402–5407.
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, et al. (2003) Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4: 111–120.
- Wang YA, Elson A, Leder P (1997) Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14590–14595.
- Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, et al. (2007) Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes. *J Immunol* 178: 103–110.
- Meuwissen R, Berns A (2005) Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev* 19: 643–664.
- Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, et al. (2001) Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410: 1111–1116.

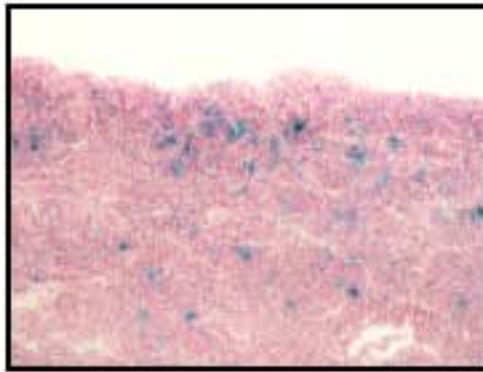
36. Jackson EL, Olive KP, Tuveson DA, Bronson R, Crowley D, et al. (2005) The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer Res* 65: 10280–10288.
37. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, et al. (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642.
38. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363–9367.
39. Eva A, Aaronson SA (1983) Frequent activation of c-kis as a transforming gene in fibrosarcomas induced by methylcholanthrene. *Science* 220: 955–956.
40. Carbone G, Borrello MG, Molla A, Rizzetti MG, Pierotti MA, et al. (1991) Activation of ras oncogenes and expression of tumor-specific transplantation antigens in methylcholanthrene-induced murine fibrosarcomas. *Int J Cancer* 47: 619–625.
41. Watanabe H, Shimokado K, Asahara T, Dohi K, Niwa O (1999) Analysis of the c-myc, K-ras and p53 genes in methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Jpn J Cancer Res* 90: 40–47.
42. Shimokado K, Watanabe H, Sumii M, Miyagawa K, Kamiya K, et al. (1998) p53 gene mutation and loss of heterozygosity of chromosome 11 in methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Jpn J Cancer Res* 89: 269–277.
43. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, et al. (2002) “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J* 21: 6225–6235.
44. Efeyan A, Ortega-Molina A, Velasco-Miguel S, Herranz D, Vassilev LT, et al. (2007) Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res* 67: 7350–7357.
45. Dovey JS, Zacharek SJ, Kim CF, Lees JA (2008) Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11857–11862.
46. Liao MJ, Yin C, Barlow C, Wynshaw-Boris A, van Dyke T (1999) Atm is dispensable for p53 apoptosis and tumor suppression triggered by cell cycle dysfunction. *Mol Cell Biol* 19: 3095–3102.
47. Bailey SL, Gurley KE, Hoon-Kim K, Kelly-Spratt KS, Kemp CJ (2008) Tumor suppression by p53 in the absence of Atm. *Mol Cancer Res* 6: 1185–1192.
48. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL (1999) Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13: 2658–2669.
49. Schmitt CA, McCurrach ME, de Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999) INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 13: 2670–2677.
50. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, et al. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91: 649–659.
51. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, et al. (1994) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4: 1–7.
52. Pantoja C, Serrano M (1999) Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18: 4974–4982.
53. Palmero I, Serrano M (2001) Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 333: 247–256.
54. Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, Criado LM, Martin-Caballero J, et al. (2004) Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18: 2736–2746.
55. Murga M, Jaco I, Fan Y, Soria R, Martinez-Pastor B, et al. (2007) Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J Cell Biol* 178: 1101–1108.

**A****B**

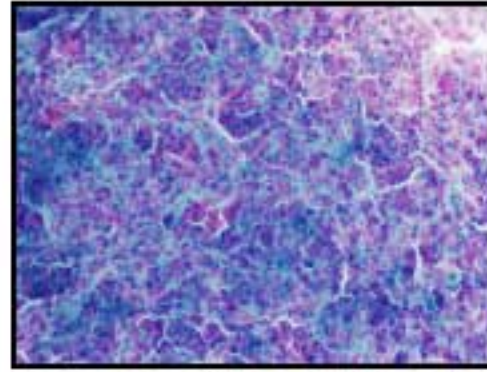
**K-Ras<sup>V12</sup> (IRES-LacZ) mice**

---

**pre-tumoral thymus**  
(2d. after oncogene induction)



**thymic lymphoma**



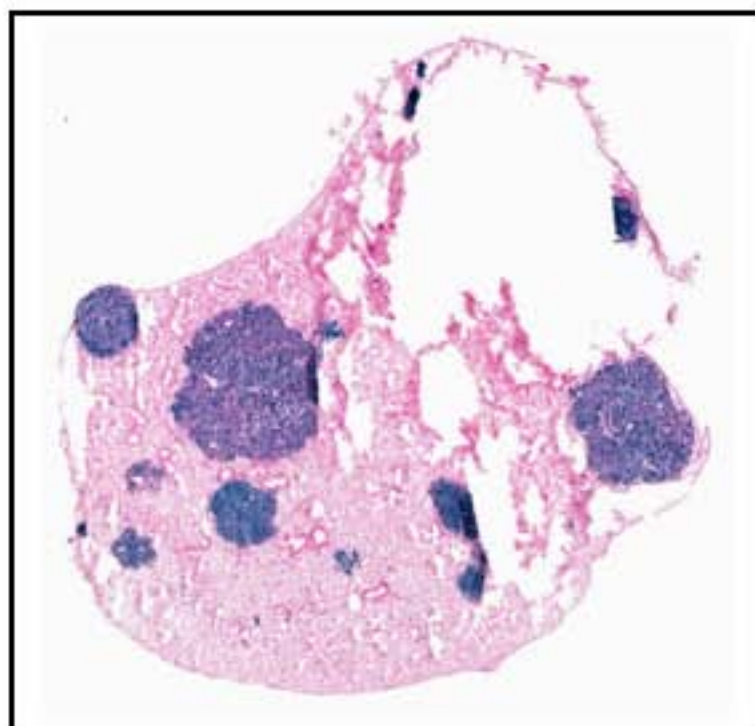
---

**LacZ staining**



**SA- $\beta$ -Galactosidase**

**K-Ras<sup>V12</sup>/ATM<sup>wt</sup>**



**K-Ras<sup>V12</sup>/ATM<sup>null</sup>**

